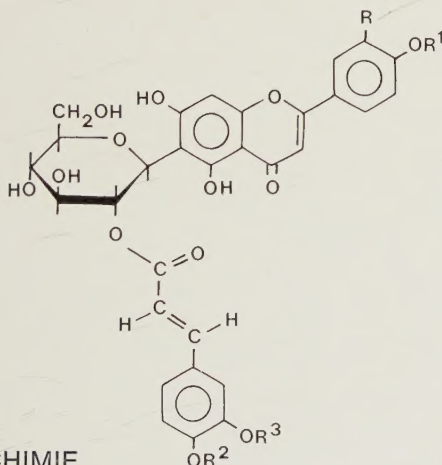


IDENTIFICATION DE CINNAMOYL C-GLUCOSYL FLAVONES
ET DE LEURS O-GLUCOSIDES DANS DES ESPÈCES
DE LA SECTION GENTIANA (= COELANTHE GRISEB.) DU
GENRE GENTIANA L.

THÈSE PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES PAR

MINH DUC LUONG

INGÉNIEUR CHIMISTE DIPLOMÉ
DE L'UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL
POUR L'OBTENTION DU GRADE
DE DOCTEUR ÈS SCIENCES



INSTITUT DE CHIMIE
DE L'UNIVERSITÉ DE
NEUCHÂTEL

FÉVRIER 1978

F. Stettler - DISS-PRINT - Fribourg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555009_0010

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL
FACULTÉ DES SCIENCES

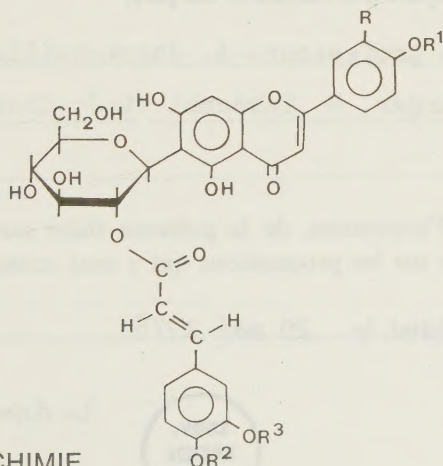
IDENTIFICATION DE CINNAMOYL C-GLUCOSYL FLAVONES
ET DE LEURS O-GLUCOSIDES DANS DES ESPÈCES
DE LA SECTION GENTIANA (= COELANTHE GRISEB.) DU
GENRE GENTIANA L.

THÈSE PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES PAR

MINH DUC LUONG

INGÉNIEUR CHIMISTE DIPLOMÉ
DE L'UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

POUR L'OBTENTION DU GRADE
DE DOCTEUR ÈS SCIENCES



INSTITUT DE CHIMIE
DE L'UNIVERSITÉ DE
NEUCHÂTEL

FÉVRIER 1978

F. Stettler - DISS-PRINT - Fribourg

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Identification de cinnamoyl-C-glucosyl-
flavones et de leurs O-glucosides dans des
espèces de la section *Gentiana* (= *Coelanth*
Griseb.) du genre *Gentiana* L.

de Monsieur Minh Duc Luong

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du jury,

MM. les professeurs A. Jacot-Guillarmod,

C. Favarger, R. Tabacchi et J. Chopin

(Lyon)

autorise l'impression de la présente thèse sans exprimer
d'opinion sur les propositions qui y sont contenues.

Neuchâtel, le 29 mai 1978



Le doyen :

J. P. Schaer

J.-P. Schaer

A ma mère et à mes soeurs

A Ai Lieu

Le présent travail a été effectué de mai 1973 à août 1977 dans les laboratoires de chimie organique de l'Institut de Chimie de l'Université de Neuchâtel sous la direction de Monsieur le Professeur André Jacot-Guillarmod, à qui nous exprimons notre profonde gratitude pour son soutien constant et les conseils précieux qu'il n'a cessé de nous témoigner au cours de nos recherches.

Notre reconnaissance est aussi adressée à Monsieur le Professeur Raphaël Tabacchi pour l'amabilité avec laquelle il nous a fait profiter de ses connaissances en chimie analytique et pour l'intérêt qu'il a porté à notre travail.

Nous tenons à remercier également Monsieur le Professeur Claude Favarger pour son efficace collaboration quant à l'identification du matériel végétal.

Nous exprimons notre vive reconnaissance à Monsieur Kurt Hostettmann qui nous a fait bénéficier de son expérience dans le domaine de la chromatographie.

Nous remercions tous ceux qui, par leur aide, ont contribué à la réalisation de ce travail, en particulier, Monsieur Michel Goetz, Madame Maryse Hostettmann-Kaldas et Monsieur Claude Saturnin.

Enfin, nos remerciements vont aussi à la maison Hoffmann-La Roche & Co, à Bâle, pour le relevé des spectres ^1H -RMN.

1. INTRODUCTION	1
2. BUT DU PRESENT TRAVAIL	6
3. TECHNIQUES DE SEPARATION	7
3.1. PRÉPARATION DU MATÉRIEL VÉGÉTAL ET EXTRACTION	7
3.2. ISOLEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE	12
3.2.1. CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION SUR POLYAMIDE	13
3.2.1.1. Principe	14
3.2.1.2. Comportements chromatographiques des substances	14
3.2.1.3. Mélanges de solvants employés	15
3.2.2. CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE SUR CELLULOSE	16
3.2.2.1. Principe	17
3.2.2.2. Comportements chromatographiques des substances	17
3.2.2.3. Mélanges de solvants employés	19
3.2.3. CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION SUR GEL DE DEXTRANE	20
3.2.3.1. Principe	21
3.2.3.2. Comportements chromatographiques des substances	21
3.2.3.3. Solvant employé	22
3.3. CONSIDÉRATIONS PRATIQUES	23
3.3.1. CHOIX DU SYSTEME CHROMATOGRAPHIQUE	23
3.3.2. CONDITIONS EXPERIMENTALES	26
3.3.2.1. Supports-solvants	26
3.3.2.2. Colonne chromatographique	27
3.3.2.3. Remplissage de la colonne	28
3.3.2.4. Introduction	31
3.3.2.5. Développement	33
3.3.2.6. Analyse CCM	36
3.3.2.7. Régénération des supports	37
4. ISOLEMENT ET PURIFICATION DES SUBSTANCES	39
4.1. PROVENANCE DU MATÉRIEL VÉGÉTAL	40
4.2. FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DE G. BURSERI LAPEYR.	
4.2.1. SUBSTANCE E*	43
4.2.2. SUBSTANCE C (C ₁ ET C ₂)	45
4.2.3. SUBSTANCE G	48
4.2.4. SUBSTANCES H ET I	50

4.3. FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DE G. PUNCTATA L.	53
4.3.1. SUBSTANCE D	56
4.3.2. SUBSTANCES J ET K	57
4.3.3. SUBSTANCES L ET M	60
4.3.4. SUBSTANCES C ₁ , G ET H	62
4.4. CRITÈRES DE PURETÉ	65
5. IDENTIFICATION ET DETERMINATION DE STRUCTURE DES SUBSTANCES ISOLEES	67
5.1. SUBSTANCES DANS G. BURSERI LAPEYR.	74
5.1.1. SUBSTANCE G	74
5.1.2. SUBSTANCE H	113
5.1.3. SUBSTANCE E*	131
5.1.4. SUBSTANCE C ₁	144
5.1.5. SUBSTANCE C ₂	153
5.1.6. SUBSTANCE I	158
5.2. SUBSTANCES DANS G. PUNCTATA L.	167
5.2.1. SUBSTANCE L	167
5.2.2. SUBSTANCE M	182
5.2.3. SUBSTANCE K	192
5.2.4. SUBSTANCE D	204
5.2.5. SUBSTANCES J, C ₁ , H ET G	215
6. RESUME ET CONCLUSION	219
7. PARTIE EXPERIMENTALE	227
7.1. DONNÉES ANALYTIQUES DES SUBSTANCES	227
7.1.1. CARACTERISTIQUES CHROMATOGRAPHIQUES ET POINT DE DECOMPOSITION	227
7.1.1.1. Substances identifiées	227
7.1.1.2. Substances témoins	229
7.1.2. COMPOSITION CENTESIMALE ET POINT DE DECOMPOSITION DES DERIVES ACETYLES	230

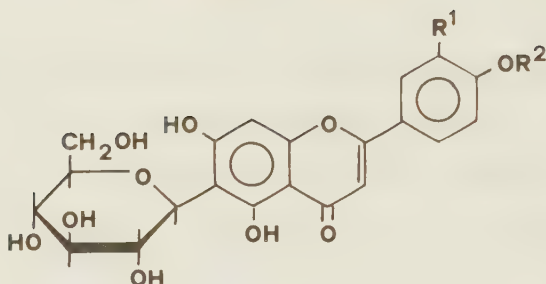
7.2. TECHNIQUES D'ANALYSES	231
7.2.1. LES REACTIONS DE DEGRADATION	231
7.2.1.1. Hydrolyse enzymatique	231
7.2.1.2. Hydrolyse par HCl dilué	231
7.2.1.3. Hydrolyse par HI	233
7.2.2. LES REACTIONS DE TRANSFORMATION	234
7.2.2.1. La silylation	234
7.2.2.2. La méthylation	234
7.2.2.3. L'acétylation	235
7.2.3. LES METHODES SPECTROSCOPIQUES	236
7.2.3.1. La spectroscopie UV	236
7.2.3.2. La spectroscopie IR	237
7.2.3.3. La résonance magnétique nucléaire	237
7.2.3.4. La chromatographie en phase gazeuse	237
7.2.3.5. La spectrométrie de masse	238

BIBLIOGRAPHIE	240
---------------	-----

1. INTRODUCTION

La phytochimie du genre Gentiana a fait l'objet de différentes études à l'Institut de Chimie de l'Université de Neuchâtel. Les espèces de la section Coelantha ont notamment retenu l'attention en ce qui concerne leur contenu en composés polyphénoliques (1) (2) (3). Cette section se caractérise par une représentation uniforme de C-glucosides flavoniques et par l'absence de xanthones dans les organes aériens, à l'exception de Gentiana lutea. Les C-glucosides isovitexine (1) et isoorientine (2) ainsi que leurs 4'-O-glucosides (3,4) ont été isolés dans toutes les espèces; Gentiana lutea possède en plus les xanthones isogentisine (5), gentioside (6) et mangiférine (7).

Dérivés flavoniques



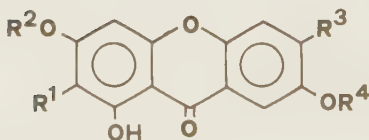
1: Isovitexine $R^1 = R^2 = H$

2: Isoorientine $R^1 = OH; R^2 = H$

3: Isovitexine-4'-O-glucoside $R^1 = H; R^2 = \beta\text{-D-glucopyranosyle}$

4: Isoorientine-4'-O-glucoside $R^1 = OH; R^2 = \beta\text{-D-glucopyranosyle}$

Dérivés xanthoniques



5: Isogentisine $R^1 = R^2 = R^3 = H; R^4 = CH_3$

6: Gentioside $R^1 = R^3 = H; R^2 = \beta\text{-primevérosyle}; R^4 = CH_3$

7: Mangiférine $R^1 = C\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyle}; R^2 = R^4 = H;$

$R^3 = OH$

Rappelons que la section Coelanthé, l'une des 19 sections du genre Gentiana, comprend 6 espèces morphologiquement bien distinctes, à savoir [4] :

- Gentiana lutea L.
- Gentiana purpurea L.
- Gentiana punctata L.
- Gentiana pannonica Scop.
- Gentiana villarsii (Griseb.) Ronn.
- Gentiana burseri Lapeyr.

Certains auteurs hésitent cependant à classer Gentiana lutea L. dans la section Coelanthé, puisque cette dernière espèce diffère des autres espèces de la section par sa corolle presque dialypétale [4]. Les travaux phytochimiques montrent également, comme nous venons de voir, le caractère particulier de cette gentiane.

Une différenciation au niveau de certaines autres espèces de la section paraît possible. En effet, dans son travail systématique, Hostettmann [5] relevait la présence dans G. punctata, G. pannonica et G. burseri de deux substances non identifiées, l'une à bas $R_f^{1)}$ et l'autre de $R_f^{1)}$ semblable à celui du gentioside. Il signalait par ailleurs une substance de haut $R_f^{1)}$

¹⁾ polyamide MN-DC₁₁, solvant MeOH 90%

dans G. burseri. Enfin, Karangwa [6] concluait à la nature flavonique de deux nouvelles substances issues de G. punctata.

En conclusion de ces travaux, nous pouvons donner un aperçu du contenu en polyphénols des différentes espèces de la section Coelanthé à l'aide du chromatogramme de la fig. 1.



Support: Polyamide MN-DC₁₁

Solvant: MeOH 90%

Révélateur: UV 350 nm

● : brun

● : jaune

1: Témoins A₁: Mangiférine D_f: Gentioside
 A: Isoorientine E: Isoorientine-4'-O-glucoside
 B: Isovitexine F: Isovitexine-4'-O-glucoside
 D, E*, G: Substances inconnues

2: G. lutea 5: G. pannonica
 3: G. purpurea 6: G. villarsii
 4: G. punctata 7: G. burseri

Fig. 1: Chromatogramme des extraits méthanoliques des espèces de la section Coelanthé

2. BUT DU PRESENT TRAVAIL

Notre travail a consisté à isoler et à déterminer la structure des substances non identifiées jusqu'à présent. A cet effet, nous avons étudié systématiquement les feuilles de Gentiana burseri Lapeyr. et les feuilles de Gentiana punctata L.

3. TECHNIQUES DE SEPARATION

La chimie des substances naturelles connaît, à l'heure actuelle, un essor considérable. Dans ce développement prodigieux, on ne peut ignorer l'apport des techniques de séparation, techniques qui permettent d'une part d'extraire les substances chimiques des tissus végétaux et d'autre part de les isoler afin de pouvoir déterminer leurs structures. Dans le cadre de notre travail, nous avons été constamment confrontés avec ces techniques, elles ont été à la base de la bonne marche et des résultats de notre recherche.

De ce fait, il nous a paru primordial d'exposer en détail les divers aspects des méthodes d'extraction et de séparation que nous avons dû mettre au point.

3.1. PRÉPARATION DU MATÉRIEL VÉGÉTAL ET EXTRACTION

Le matériel végétal renferme une grande quantité d'eau, environ 90% de son poids. Afin d'éviter que l'eau nuise à l'efficacité de l'extraction en formant avec les solvants organiques des mélanges hétérogènes, le matériel végétal, en

l'occurrence les feuilles de gentiane sont soumises à un séchage. Celui-ci doit être rapide afin d'inhiber toutes réactions enzymatiques conduisant à la formation de produits de dégradation, d'où une estimation erronée de la composition chimique de la plante étudiée. Cependant, une température excessive est aussi à éviter car nombreuses sont les substances qui sont sensibles à une grande chaleur. Les feuilles sont donc séchées à l'étuve à une température de 40°C jusqu'à dessiccation complète (environ 48 heures).

Les substances naturelles sont intimement incorporées dans les tissus cellulaires des feuilles. De ce fait, une pulvérisation fine des feuilles séchées s'avère indispensable. Celle-ci permet de briser en partie les structures cellulaires des feuilles dégageant ainsi les substances qui seront plus facilement extraites par les solvants.

Le but est d'obtenir un extrait brut contenant quantitativement les flavonoïdes exempts, si possible, d'autres substances pouvant gêner ultérieurement les séparations et les purifications. L'extraction revêt, en somme, le caractère d'un fractionnement préliminaire mais dont l'importance n'est pas à négliger. En effet, une extraction efficace permet d'obtenir, d'une part, quantitativement la classe de substances à étudier, chose appréciable dans le cas des substances en trace, et d'autre part,

un extrait partiellement purifié riche en composés recherchés.

Actuellement, deux techniques d'extraction sont préconisées:

- méthode à "contre-courant", basée sur le phénomène de partage
- méthode des solvants successifs, basée sur la solubilité des produits à extraire.

Dans la méthode à "contre-courant", la poudre végétale est extraite à chaud, à l'aide d'un alcool, généralement le méthanol. L'extrait méthanolique ainsi obtenu est ensuite fractionné pour éliminer les substances étrangères. A cette fin, on utilise les coefficients de partage entre l'eau et une phase organique non miscible. L'extrait méthanolique est concentré et repris dans l'eau bouillante. Le filtrat obtenu est épuisé successivement par quelques solvants organiques, éther, acétate d'éthyle, n-butanol ou par des solvants de polarité croissante.

La méthode des solvants successifs consiste simplement à épuiser la poudre végétale par des solvants de polarité croissante. L'extraction s'effectue soit à l'aide d'un Soxhlet, soit par chauffage à reflux sous agitation continue.

En somme, les deux modes d'extraction ne constituent qu'une séparation grossière des substances présentes dans le matériel végétal selon leur polarité.

Nous avons adopté, pour l'extraction de nos substances, la méthode des solvants successifs. Ce choix est guidé par les avantages qu'elle offre par rapport à la méthode à "contre-courant". En effet, le matériel végétal étant successivement épuisé par des solvants de polarité différente, le risque de négliger la présence de substances lipophiles ou peu polaires est à exclure. D'autre part, la méthode est quantitative et moins laborieuse. D'ailleurs, la méthode des solvants successifs a fait ses preuves au cours des études phytochimiques du genre Gentiana effectuées à l'Institut de Chimie de Neuchâtel [5].

L'extraction des feuilles de gentiane s'effectue ainsi:

A 150 g de feuilles séchées et pulvérisées de gentiane, on additionne 1 g de carbonate de calcium afin de neutraliser les acides organiques. Le mélange est chauffé à reflux avec 1,5 l de ligroïne sous agitation continue. Après 24 heures, la suspension est filtrée sur un Büchner. Le filtrat est ensuite concentré sous pression réduite à un volume de 50 ml et analysé par chromatographie sur couche mince (CCM). Le résidu est de nouveau extrait avec 1,5 l de ligroïne pendant 24 heures. Après la li-

groïne, l'extraction se poursuit comme précédemment avec l'éther, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le méthanol (selon le schéma de la fig. 2).

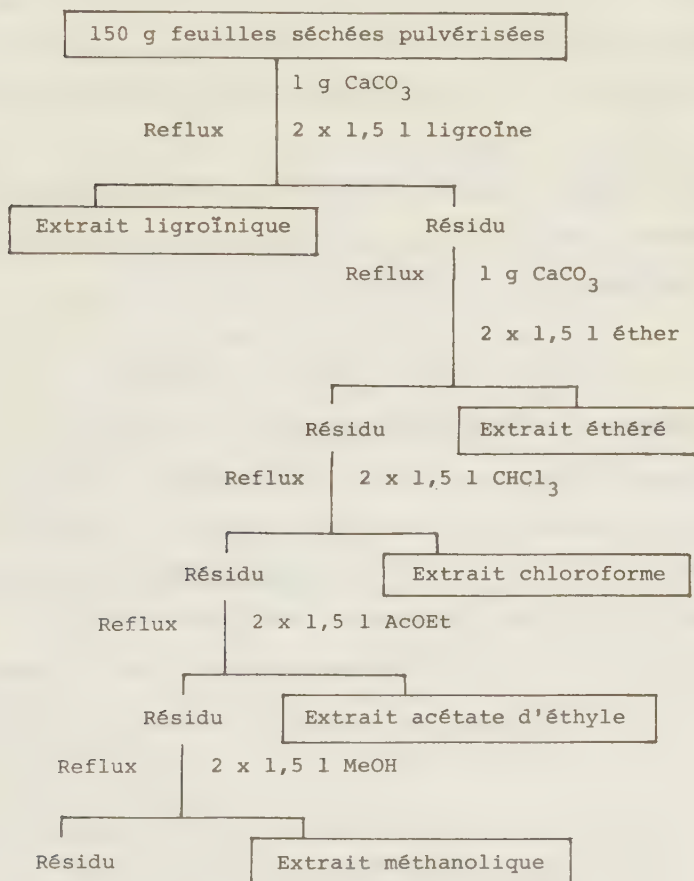


Fig. 2: Schéma d'extraction

Les essais d'extraction selon la méthode des solvants successifs nous ont permis de noter les faits suivants:

- les extractions à la ligroïne, à l'éther et au chloroforme doivent se faire à deux reprises avec au moins 1,5 l de solvant pour 150 g de matériel végétal sec, au risque de retrouver de la chlorophylle dans l'extrait méthanolique.
- l'extraction au chloroforme est profitable puisqu'elle permet d'obtenir ultérieurement un extrait d'acétate d'éthyle exempt de chlorophylle.
- après traitement du matériel végétal au méthanol, l'action subséquente d'un mélange méthanol-eau (1:1) puis d'eau ne permet pas d'extraire d'autres flavonoïdes.

Les analyses par CCM des différents extraits montrent que les composés qui nous intéressent sont concentrés dans la fraction méthanolique. Nos travaux porteront donc uniquement sur cette dernière.

3.2. ISOLEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

L'extraction a permis de fractionner les substances contenues dans le matériel végétal selon leur type de structure.

L'étape suivante consiste à effectuer une séparation plus sélective jusqu'à l'obtention de substances pures.

La chromatographie sur colonne se révèle être la technique de choix.

Elle présente l'avantage par rapport à la CCM préparative ou à la chromatographie sur papier de permettre de traiter des mélanges complexes et de mettre en jeu des quantités beaucoup plus grandes. De plus, on ne se heurte pas au problème de la désorption des produits, phénomène inhérent à la CCM préparative et à la chromatographie sur papier.

Selon la complexité du mélange à séparer, nous avons utilisé la chromatographie d'adsorption sur polyamide, la chromatographie de partage sur cellulose ou encore la chromatographie d'exclusion sur gel de dextrane.

3.2.1. CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION SUR POLYAMIDE

Le polyamide et le gel de silice sont les deux adsorbants les plus appropriés à la séparation des flavonoïdes. Cependant avec le polyamide, le risque d'une adsorption irréversible est minime contrairement au gel de silice. De plus, avec les poly-

amides pour colonne et pour CCM du commerce, la transposition des séparations effectuées par CCM en chromatographie sur colonne (CC) est possible.

3.2.1.1. Principe

L'adsorption dépend de la formation réversible des liaisons hydrogène entre l'atome d'hydrogène du groupe phénolique de la substance et l'atome d'oxygène de la fonction carbonyle du groupe amide du support. L'élution des substances résulte de la rupture de ces liaisons par un solvant capable de former lui-même des liaisons hydrogène avec la surface de l'adsorbant; il y a donc déplacement de la substance par solubilisation. Selon Bark & Graham [7], la solubilisation est due à une solvation des parties hydrophobes de la molécule avec les solvants non-aqueux et à une solvation du groupe phénolique avec les solvants aqueux.

3.2.1.2. Comportements chromatographiques des substances

La chromatographie sur polyamide met donc en compétition deux propriétés physiques des substances: la solubilité et l'adsorption. Celles-ci expliquent le comportement chromato-

graphique des composés polyphénoliques qui se résume ainsi:

Pour un même composé, on observe par CCM:

- le R_f est d'autant plus bas que le nombre de groupes hydroxyles phénoliques augmente
- le R_f augmente avec le nombre de sucres
- l'introduction d'un groupe méthoxyle fait croître le R_f
- l'acidité d'un groupe hydroxyle phénolique diminue le R_f

Des hypothèses de structure de composés peuvent donc être formulées en se basant sur la comparaison des valeurs R_f .

3.2.1.3. Mélanges de solvant employés

De nombreux mélanges binaires, ternaires et quaternaires de solvants ont été essayés. Les différents composants de ces mélanges se résument à l'acide acétique, à l'eau, au méthanol, à l'éthanol, à l'isopropanol, au n-butanol, à l'acétate d'éthyle, au chloroforme et au benzène. Parmi ces mélanges, seuls deux nous sont d'une grande utilité dans la séparation de nos produits:

Mélange binaire: PM: méthanol-eau à différentes proportions (1:1 à 9:1). Ce mélange aqueux nous a permis d'effectuer un

fractionnement préliminaire de l'extrait méthanolique. Le mélange initial d'élution se révèle être du MeOH-H₂O (1:1). En effet, des essais avec de plus fortes concentrations d'eau nous ont montré que les zones subissaient un élargissement, ce qui provoque au cours du développement un enchevêtrement des zones, donc une mauvaise séparation.

Mélange ternaire: PB: benzène-méthanol-acide acétique avec les proportions (45:32:16) et (65:32:16). Ce mélange de solvants organiques possède un bon pouvoir de séparation pour les substances à valeur R_f inférieure à 0.5 mais, par contre, une mauvaise résolution pour les substances à R_f supérieures. En effet, par rapport au mélange MeOH-H₂O, il augmente d'une manière différentielle la valeur R_f des substances à bas R_f. L'inconvénient que présente ce mélange est qu'il est toxique et irritant. D'autre part, le remplissage des colonnes avec ce solvant présente quelques difficultés dont nous parlerons plus loin.

3.2.2. CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE SUR CELLULOSE

Les séparations de flavonoïdes par chromatographie de partage ont été couramment effectuées soit sur gel de silice, soit sur cellulose. Pour notre part, nous avons préféré utiliser la cellulose pour l'unique raison que la transposition des

séparations effectuées sur silicagel par CCM en chromatographie sur colonne s'avère difficile, aléatoire.

La cellulose est un support qui possède une capacité faible comparée à celle de la polyamide. Toutefois, elle nous est d'une grande aide puisqu'elle nous a permis d'effectuer des séparations qui se sont révélées impossibles sur polyamide. Ce fait réside dans le pouvoir de résolution de la cellulose, résolution qui est donc basée sur le phénomène de partage.

3.2.2.1. Principe

Les substances à séparer se partagent entre deux phases liquides non miscibles dont l'une, la phase stationnaire, est répartie sur la cellulose et dont l'autre, la phase mobile, se déplace. Une substance sera d'autant plus déplacée que sa solubilité dans la phase mobile sera plus grande que dans la phase stationnaire.

3.2.2.2. Comportements chromatographiques des substances

Contrairement à la chromatographie d'adsorption, la chromatographie de partage laisse planer quelques doutes quant à

la prévision des comportements chromatographiques des produits. En effet, les valeurs R_f des substances sont non seulement fonction de la solubilité de ces dernières dans la phase mobile (phénomène de partage), mais aussi, dans une certaine mesure, fonction de l'adsorption de ces dernières sur le support. Toutefois, pour les mélanges de solvants que nous avons employés, nous sommes à même de dégager les faits suivants relatifs à chacun des mélanges:

Acide acétique - eau (CA):

Ce mélange aqueux à différentes proportions confère aux flavonoïdes les mêmes comportements chromatographiques que sur polyamide, à savoir:

- augmentation du R_f avec le nombre de sucres
- diminution du R_f avec le nombre de groupes hydroxyles
phénoliques

Cependant, l'introduction d'un groupe méthoxyle abaisse le R_f de la substance.

n-BuOH-AcOH-H₂O et CHCl₃-AcOH-H₂O (CB et CC):

Ces deux mélanges confèrent aux flavonoïdes un effet différent quant à leurs comportements sur cellulose:

- diminution du R_f avec le nombre de sucre

- diminution du Rf avec le nombre de groupes hydroxyles
phénoliques

3.2.2.3. Mélanges de solvants employés

Des essais que nous avons effectués, il ressort que seuls les mélanges aqueux contenant de l'acide acétique séparent nos produits. Comme ces mélanges renferment cet acide dans des proportions pouvant varier de 10% à 50%, nous nous sommes assurés que nos produits ne subissaient aucune dégradation.

Mélanges binaires: CA: acide acétique - eau

Ces mélanges aqueux d'acide acétique à différentes proportions (5% - 15%), nous ont été utiles dans la mesure où ils nous ont permis d'obtenir des fractions enrichies en produits à isoler. L'inconvénient est qu'ils élargissent les zones au cours du développement, surtout lorsque la proportion en acide est faible.

Mélanges ternaires: CB: n-butanol - acide acétique - eau

(4:1:5) ph. sup.

CC: chloroforme - acide acétique - eau

(50:45:5)

Ces deux systèmes de solvants permettent des séparations

fines. En effet, alors que dans tous les autres systèmes chromatographiques, un mélange donné ne formait qu'une seule zone, ces systèmes de solvants la séparaient en deux ou plusieurs autres zones. Le développement des colonnes de cellulose avec le mélange CC exige un temps relativement long par rapport aux autres systèmes de solvants. D'autre part, comme ce mélange renferme 45% d'acide acétique, des précautions doivent être prises lors de l'usage.

Le mélange isobutanol - acide acétique - eau (10:4:7) a aussi été essayé; il possède un pouvoir de séparation légèrement plus faible que le mélange CB.

3.2.3. CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION SUR GEL DE DEXTRANE

Quelques auteurs tels que K.M. Johnston et coll. [8] ont utilisé du gel de dextrane pour séparer des flavonoïdes. A priori, cette technique ne peut être appliquée qu'à des mélanges peu complexes de produits ou de mélanges de produits présentant de grandes différences dans les dimensions moléculaires. Nous avons employé la chromatographie d'exclusion dans le dessein de procéder à une ultime purification des produits isolés pour éliminer les traces d'impuretés qui pourraient gêner la cristallisation éventuelle des produits, cristallisation d'ailleurs

difficile pour les composés flavoniques. Le deuxième but est de purifier certaines fractions complexes obtenues après passage d'un extrait sur colonne de polyamide. En effet, nous avons observé que cette purification favorisait par la suite la séparation des produits d'un mélange complexe.

3.2.3.1. Principe

La chromatographie d'exclusion sur gel de dextrane encore appelé filtration sur gel est une technique de fractionnement en fonction des dimensions moléculaires. Lors de l'élution par un solvant, les molécules de dimensions supérieures aux pores du gel ne pouvant pénétrer dans les grains du gel sont entraînées par la phase liquide à l'extérieur de ces dernières et se trouvent ainsi éluées les premières. Quant aux petites molécules, elles s'infiltreront dans les grains du gel et de ce fait sont plus ou moins retenues selon leur dimension et leur forme; elles seront éluées du gel dans l'ordre des masses moléculaires décroissantes.

3.2.3.2. Comportements chromatographiques des substances

Le comportement des flavonoïdes sur gel de dextrane est

essentiellement fonction des dimensions moléculaires des substances. Néanmoins, lors des purifications des mélanges complexes de nos substances, nous avons observé un ordre d'élution des produits selon le nombre croissant de groupes hydroxyles phénoliques. Ce fait a aussi été mentionné par K.M. Johnston et coll. [8]. Il s'avère donc qu'un phénomène autre que celui d'exclusion intervient: l'adsorption. En effet, il est connu que les gels de dextrane possèdent une affinité pour les composés cycliques aromatiques et les composés qui contiennent des groupes hydroxyles et (ou) carboxyliques [9]. Selon Determann, l'adsorption des composés aromatiques dépend de l'interaction des systèmes d'électrons π du composé avec les liaisons éther du dextrane. Quant à l'adsorption due aux groupes hydroxyles et carbonyles, le phénomène résulte de l'établissement de liaisons hydrogène entre ces groupes fonctionnels des composés et les groupes hydroxyles du dextrane.

3.2.3.3. Solvant employé

Notre objectif premier lors de l'emploi de dextrane est de purifier des substances ou des mélanges complexes de substances; à cet effet, nous avons utilisé un solvant pouvant être facilement éliminé et dont la polarité permet d'éluer les impuretés, principalement des sucres, sans pour autant éluer en même temps nos flavonoïdes. Le solvant de choix est le méthanol.

Nous avons aussi essayé des mélanges aqueux tels que méthanol - eau (9:1). Cependant, les essais ne sont guère concluants pour nos substances. Mentionnons toutefois qu'avec un mélange de solvants polaire-polaire ou polaire-apolaire, un phénomène autre que l'adsorption intervient: le partage.

3.3. CONSIDERATIONS PRATIQUES

L'efficacité d'une séparation chromatographique sur colonne dépend avant tout du système chromatographique support-solvant et des conditions expérimentales, conditions qui varient d'un praticien à un autre. L'importance de ces deux facteurs explique l'exposé qui suit:

3.3.1. CHOIX DU SYSTEME CHROMATOGRAPHIQUE

Ce choix s'opère au moyen de la chromatographie sur couche mince, la seule technique rapide qui permet d'envisager des prédictions pour les séparations sur colonne. Ce choix est tributaire du type de chromatographie que l'on désire réaliser, cela en fonction de la nature des substances à séparer.

La chromatographie d'adsorption permet de séparer efficace-

ment des composés qui présentent des différences dans la nature, le nombre et la position des substituants polaires. Quant à la chromatographie de partage, bien que de telles séparations soient possibles, son efficacité tient surtout dans la résolution de composés qui se différencient par leur solubilité dans un solvant donné, solubilité qui est, d'ailleurs, fortement dépendante de la dimension moléculaire. Ces informations ne peuvent être mises à profit que lorsque les structures des composés d'un mélange sont connues. Pour nos problèmes de séparation, ce cas ne se présente pas. Il nous a donc fallu nous baser sur un autre critère. Comme le polyamide possède une capacité et un pouvoir de résolution supérieurs à ceux de la cellulose, les premiers essais de solvants s'effectueront par CCM de polyamide.

La recherche du système de solvant est entreprise de la manière suivante:

On chromatographie le mélange sur plaque de polyamide avec le mélange de solvant méthanol-eau (9:1) pour estimer la polarité des divers constituants du mélange en se basant sur les valeurs R_f de ces derniers.

On effectue des essais de séparation par CCM de polyamide avec des mélanges de solvants de préférence aux solvants purs

qui possèdent un pouvoir éluant plus faible. Ces mélanges seront choisis en fonction de la polarité des composés à séparer et de sorte que les valeurs R_f de ces derniers s'échelonnent dans l'intervalle 0,4-0,6 pour un mélange simple de quelques composés.

Le système de solvant qui conduit au dédoublement d'un mélange en composés de valeurs R_f différentes d'au moins 0,1 est soumis à un examen approfondi afin de déterminer le ou les composants du système ayant une influence déterminante sur la séparation. Pour ce faire, la teneur de chacun des composants est augmentée par rapport aux autres qui conservent leur proportions initiales.

Les essais se poursuivent en faisant varier graduellement les proportions du ou des composants déterminés précédemment afin d'acquérir les proportions conduisant à une séparation optimale.

Si ces essais ne sont guère concluants, d'autres seront tentés sur couche mince de cellulose. Dans le cas où il est impossible d'obtenir une séparation acceptable de tous les produits d'un mélange, tant sur couche de polyamide que de cellulose, le mélange en question est soumis à un fractionnement grossier sur colonne au moyen du système chromatographique le mieux adapté. Les fractions ainsi obtenues sont ensuite soumises à des analyses par CCM afin de déterminer le couple

support-solvant susceptible de les séparer.

En effet, nous avons observé que les séparations sont souvent très mauvaises pour les mélanges complexes. Ce fait est probablement dû à des interactions entre substances et impuretés. Les séparations deviennent meilleures lorsque le mélange a subi, au préalable, soit une purification sur colonne de sephadex LH20 soit un fractionnement sur colonne de polyamide ou de cellulose.

3.3.2. CONDITIONS EXPERIMENTALES

3.3.2.1. Supports-solvants

Les caractéristiques des supports utilisés en chromatographie sur colonne sont les suivants:

- polyamide SC6 de Macherey-Nagel du type polycaprolactame; la grosseur des grains étant inférieure à 0,16 mm
- cellulose microcristalline de Merck; la grosseur des grains étant de 3-40 μ
- sephadex LH20 de Pharmacia du type hydroxypropyldextrane; la grosseur des grains étant de 10-40 μ .

Les solvants employés dans les mélanges sont fournis par Siegfried et Thommen Chemie de qualité purum et sont préalablement purifiés par distillation à l'aide d'une colonne Vigreux de 60 cm de longueur.

3.3.2.2. Colonne chromatographique

Ces colonnes sont constituées par des tubes de verre de diamètre constant dont l'une des extrémités est dotée d'un robinet terminé par un tube et l'autre extrémité d'un rodage femelle prévu pour adapter le système d'introduction du solvant. Pour retenir le support dans la colonne, une fritte de porosité 1 est soudée aux parois de la colonne au-dessus du robinet de telle manière que le volume mort soit réduit au maximum cela afin d'éviter des perturbations dans la composition des fractions éluées. (Voir figure 2 en annexe).

La section de la colonne est fonction de :

- La quantité de mélange à séparer. Il est nécessaire que la zone initiale soit de faible épaisseur. La hauteur du support doit être suffisante afin d'offrir aux produits la distance optimum de migration au cours de laquelle peut s'effectuer la séparation. La complexité du mélange à séparer exigera une hauteur de support accrue.

- Lorsqu'un système résoud mal un mélange, la section de la colonne doit être augmentée ainsi que la hauteur du support.

Cependant, dans tous les cas, les dimensions ne sont variées que dans la mesure où la hauteur du support et le diamètre de la colonne conservent un rapport fluctuant entre 10 et 20. En effet, pour un rapport bas, la distance de migration est trop courte pour permettre une quelconque séparation alors que pour un rapport élevé, les zones subissent un élargissement au cours du développement. A titre indicatif, 40 mg de mélange sont chromatographiés sur une colonne de polyamide de diamètre interne 2,5 cm et de hauteur 35 cm. Sur une colonne de cellulose de même dimension, la quantité introduite est diminuée de moitié.

3.3.2.3. Remplissage de la colonne

Il s'effectue selon la voie humide qui consiste à préparer une suspension du support dans le solvant de développement et à la verser dans la colonne. Au premier abord, cette technique est simple et rapide, mais en fait il est nécessaire de prendre des précautions qui se révèlent indispensables.

Le volume mort sous la fritte de la colonne doit être d'abord rempli de solvant afin d'éviter un dessèchement du support. Afin de permettre un écoulement sans contrainte, les bulles d'air

doivent être éliminées du support, ce qui est obtenu par aspiration du solvant à travers la fritte, par la partie supérieure de la colonne, à l'aide d'une trompe à eau. Lorsque les bulles d'air ont été résorbées, et le niveau du liquide amené à quelques centimètres au-dessus de la fritte, l'aspiration est arrêtée. La colonne chromatographique est ensuite disposée dans une position rigoureusement verticale, faute de quoi on obtient un remplissage irrégulier.

On prépare le support de la manière suivante: une suspension fluide de celui-ci dans le solvant de développement est agitée puis décantée; on remplace le liquide surnageant par du solvant frais et répète ainsi l'opération afin d'éliminer autant que possible les particules fines et les impuretés plus légères.

Lors de la mise en jeu d'un support neuf, il est nécessaire de le laisser gonfler au préalable dans le solvant pendant 24 heures. Ce temps peut être réduit à 2 à 3 heures lorsqu'il s'agit d'un support qui a déjà été employé.

Une attention particulière doit être apportée lors de l'usage de mélanges aqueux de solvants organiques renfermant un élément non miscible à l'eau. Le mélange n-butanol-acide acétique-eau dans les proportions (4:1:5) donne deux phases dont seule la phase supérieure, saturée d'eau, est utilisée

en tant qu'éluant. Cette phase, qui ne doit être mise en présence de cellulose que sous une forte agitation, doit être auparavant bien décantée pendant au moins une heure de temps. Si de telles précautions ne sont pas prises, il se forme soit une pâte visqueuse soit une suspension floconneuse en raison de la présence de molécules d'eau en suspension dans la phase organique. On observe par la suite un tassement irrégulier du support, l'emprisonnement de bulles d'air dans la colonne, une vitesse d'écoulement fortement réduite et la formation discontinue d'un film d'eau entre le support et la paroi de la colonne. Des difficultés semblables se rencontrent lors du remplissage d'une colonne avec les couples cellulose-chloroforme/acide acétique/eau (50:45:5) et polyamide-benzène/méthanol/acide acétique (65:32:16) bien que ces systèmes de solvant ne forment en principe qu'une seule phase dans les proportions indiquées. Pour pallier ces difficultés, la proportion des composants miscibles à l'eau, comme le méthanol, doit être légèrement augmentée afin d'homogénéiser le mélange de solvants.

Finalement, la suspension fluide est rendue épaisse pour qu'elle ne retienne pas les bulles d'air et elle est versée en une seule fois, autant que possible, dans la colonne dont le robinet est ouvert pour permettre un débit rapide de 5 gouttes toutes les secondes. Un tel débit est nécessaire pour que la sédimentation de la poudre soit rapide et régulière et que d'éventuelles bulles d'air ne soient emprisonnées. Le

débit se réduit de lui-même au fur et à mesure du remplissage mais en aucun cas il ne doit être augmenté sinon il en résulterait des couches de tassement différentes. On peut éventuellement adapter, de façon hermétique, un entonnoir à poudre à la colonne; il fonctionnera comme réservoir pour la suspension, si le volume de celle-ci est supérieur à celui de la colonne. Au fur et à mesure du remplissage, on ajoute du solvant de manière à ce que le support en soit constamment baigné. Le remplissage terminé, on relie la colonne au réservoir de solvant afin de continuer le lavage et le tassement de la poudre. Le lavage est poursuivi jusqu'à la disparition de tout résidu dans l'éluant évaporé à sec.

3.3.2.4. Introduction du mélange à séparer

L'échantillon ou l'extrait brut à chromatographier est dissous dans le minimum de solvant de développement afin d'obtenir une zone initiale la plus étroite possible. La solution obtenue ne doit pas être pour autant trop visqueuse, ce qui conduit à un front de déplacement irrégulier. En général, le rapport des hauteurs du support et de la zone fluctue entre 40 et 50. Ces normes sont difficiles à respecter quand le mélange à séparer se dissout mal dans le solvant de développement. Dans le cas de mélanges de solvants, la difficulté est

aplanie en accroissant la proportion du composant dans lequel l'échantillon est facilement soluble. Si toutefois de fines particules restent en suspension, la solution est filtrée avant d'être déposée sur le support. Il est à relever qu'un échantillon peu soluble dans un système de solvant peut être séparé par chromatographie sur colonne avec ce même système de solvants.

En vue d'effectuer le dépôt de la solution sur la colonne, on amène le solvant surnageant jusqu'à fleur du support puis, le robinet de la colonne étant fermé, on introduit la solution à séparer à l'aide d'une pipette pasteur; on laisse couler cette solution lentement sur la paroi interne de la colonne, en opérant par mouvement circulaire, afin d'éviter tout risque de détérioration de la surface du support. En ouvrant le robinet de la colonne, on laisse ensuite la solution pénétrer lentement jusqu'à fleur d'adsorbant. Une attention toute particulière est à observer lors de cette étape.

Lorsque la zone initiale présente, dès sa formation, un front irrégulier, une correction du front s'impose. Pour ce faire, on laisse la solution pénétrer dans le support jusqu'à ce que le front atteigne la moitié de la largeur prévue de la zone initiale et, à l'aide d'une baguette de verre, le support est brassé jusqu'au niveau du front, l'écoulement du solvant

étant maintenu durant l'opération. Le brassage s'opère non seulement par des mouvements circulaires de la baguette, mais aussi par des mouvements horizontaux de sorte que celle-ci balaye toute la surface du support, afin d'éviter la formation d'un cône. Le brassage du support s'avère aussi nécessaire lorsque la solution à chromatographier est visqueuse ou concentrée.

La solution ayant entièrement pénétré dans le support, l'écoulement est alors interrompu et la paroi intérieure de la colonne est précautionneusement lavée avec le minimum de solvant. On laisse ensuite pénétrer le solvant de lavage à fleur du support. Enfin le volume mort au-dessus du support est rempli avec du solvant. Lors des opérations précitées, il faut veiller à ce que la surface du support soit constamment humide afin d'éviter tout fendillement. Un tube capillaire est branché à la sortie de la colonne et le développement est aussitôt effectué.

3.3.2.5. Développement

Le développement se fait par élution: à cet effet, on fait passer continuellement du solvant à travers la colonne jusqu'à ce que les différentes zones formées sortent.

L'alimentation de la colonne en solvant se fait à l'aide d'un dispositif simple permettant de conserver une pression de travail constante (fig. 2). Celui-ci se compose d'un récipient rodé R faisant office de réservoir de solvant dans lequel plongent deux tubes de verre de même longueur (diamètre interne: 5 mm), l'un A communicant avec l'air ambiant et l'autre B avec la colonne par l'intermédiaire d'un tuyau souple C (diamètre interne: 5 mm) et d'un tube de verre D (diamètre interne: 5 mm) adapté au sommet de la colonne. Un tube de verre E émergeant du haut de la colonne permet à ce dernier de communiquer avec l'extérieur. L'amorçage de l'alimentation en solvant de la colonne s'effectue en aspirant lentement l'air par le tube E; le solvant passe du réservoir R à la colonne. Dès qu'aucune bulle d'air persiste dans les points B C D et que l'extrémité D plonge dans le solvant, la colonne est isolée de l'air ambiant à l'aide d'une pince Hoffmann actionnant sur un tuyau en caoutchouc fixé au tube E. La pression de travail est donnée par la différence de niveau H entre la base du tube d'entrée d'air A dans le réservoir R et l'extrémité libre du capillaire. A chaque volume de solvant entrant dans la colonne, correspond une bulle d'air se dégageant dans le récipient de solvant; ce qui permet de contrôler, d'une manière rapide, l'amorçage du dispositif.

Le développement de la colonne est suivi à la lumière ultraviolette tout en se référant aux séparations obtenues auparavant par CCM. Les proportions des composants du mélange de solvant

sont éventuellement modifiées en cours de développement afin d'obtenir la séparation optimale. Cela se fait tout simplement en changeant le contenu du récipient de solvant tout en laissant intact le volume de solvant surmontant le support dans la colonne. Ainsi, le nouveau et l'ancien solvant se mélangent graduellement et le support n'est pas soumis à un changement brusque de solvant.

Le débit de l'écoulement dépendant d'une part de la position de la colonne par rapport à l'extrémité libre du capillaire et d'autre part de la différence de niveau H, est réglé par conséquent en modifiant les positions relatives de la colonne et du réservoir par rapport à l'extrémité libre du capillaire; le robinet de la colonne étant complètement ouvert. Celui-ci est maintenu constant durant le développement de la colonne et est réglé à 60 ml/heure pour les colonnes de polyamide et de sephadex et à 30 ml/heure pour les colonnes de cellulose.

3.3.2.6. Analyse par CCM

L'éluant est fractionné à l'aide d'un collecteur de fractions Ultrarac LKB 7000. Le volume des fractions recueillies est fonction de la quantité de mélange chromatographié et de la séparation envisagée et varie entre 1 et 15 ml. Celles-ci sont successivement analysées par CCM avec le même système

chromatographique que celui de la chromatographie sur colonne. Les fractions identiques sont ensuite réunies et soumises à de nouvelles analyses par CCM soit pour le contrôle de la pureté soit pour déterminer le couple support-solvant susceptible de résoudre une nouvelle séparation.

Les plaques employées en CCM sont du type cellulose microcristalline F et silicagel 60F254 préfabriquées par la firme Merck (Darmstadt) et polyamide Macherey-Nagel DC₁₁ et DC₆ (Dürer) fabriquées par nos soins à l'aide d'un étaleur Desaga (épaisseur: 0.25 mm).

Le dépôt des fractions se fait à l'aide d'un guide spot Camag et d'une micropipette de 5 µl. Les quantités déposées sont estimées aux lumières visible et UV par comparaison aux concentrations connues (10 à 20 µg par spot) de témoins appropriés.

3.3.2.7. Régénération des supports

La poudre de polyamide est régénérée, après chaque emploi, en faisant passer à travers la colonne une solution de soude caustique à 5% qui dégrade les substances encore adsorbées résiduellement et facilite leur élution: le traitement est maintenu jusqu'à ce que l'éluant soit basique. La colonne est en-

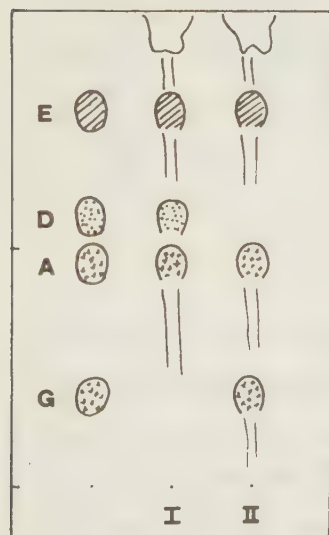
suite lavée à l'eau désionisée jusqu'à neutralité puis avec une solution d'acide acétique à 5% pour éluer les dernières traces de substances. Le polyamide est finalement lavée à l'eau désionisée jusqu'à neutralité

Les poudres de cellulose et de sephadex sont régénérées simplement par élution continue avec le solvant de développement ou éventuellement avec un solvant plus polaire jusqu'à ce que l'éluat soit propre. (Contrôle par évaporation d'une quantité de 20 ml de solvant).

Lors de la régénération, la solution basique provoque fréquemment des contractions du polyamide; aussi à chaque emploi, les colonnes de polyamide doivent être remplies de nouveau. Quant aux colonnes de cellulose et de sephadex, un nouveau remplissage n'est pas nécessaire si la régénération a été effectuée avec le même solvant de développement.

4. ISOLEMENT ET PURIFICATION DES SUBSTANCES

En vue de l'isolement des substances signalées par K. Hostettmann dans son étude phytochimique de la section Coelanthé du genre Gentiana [5], à savoir les substances E*, D et G, les feuilles pulvérisées de G. burseri Lapeyr. et G. punctata L. ont été soumises aux extractions selon le schéma établi précédemment (fig. 1). A partir de 150 g de feuilles séchées et pulvérisées de G. burseri Lapeyr. et de G. punctata L., nous obtenons respectivement 49,5 g et 56,5 g d'extraits méthanoliques.



Support: Polyamide MN DC₁₁

Solvant: MeOH 90%

Révéléateur: KOH 2N/MeOH +

UV 350 nm

E: isoorientine-4'-O-glucoside

A: isoorientine

D et G: témoins inconnus [5], [6]

I: Gentiana punctata L. (100 µg)

II: Gentiana burseri Lapeyr. (70 µg)

⬮ : brun

⬮ : jaune

⬮ : vert

○ : blanc

⬮ : orange

Fig. 3: Chromatogramme des extraits méthanoliques de Gentiana punctata L. et de Gentiana burseri Lapeyr.

Les substances A et E à teneur élevée sont détectées à partir d'un dépôt de 30 µg pour l'extrait de Gentiana punctata L. et de 40 µg pour l'extrait de Gentiana burseri Lapeyr.; les substances D et G le sont seulement pour un dépôt respectif de 100 µg et 70 µg.

Par portions de 15 g, chaque extrait est fractionné par chromatographie sur colonne de polyamide (l= 100 cm, d= 5 cm) avec comme solvant initial le mélange MeOH-H₂O dans le rapport (1:1). Ce dernier est augmenté à (7:3) lors de l'apparition dans l'éluat de composés flavoniques à hauts R_f, le bloc des sucres les ayant déjà précédé. La teneur en méthanol n'est finalement augmentée dans les proportions (9:1) que lorsque les composés à R_f moyens apparaissent à la sortie de la colonne.

4.1. PROVENANCE DU MATÉRIEL VÉGÉTAL

Les feuilles de Gentiana burseri Lapeyr. ont été récoltées au Col de Puymorens dans le département des Pyrénées orientales (France) à une altitude de 1500 m. Quant aux feuilles de Gentiana punctata L., elles ont été récoltées à Engelberg (Obwald) à une altitude de 1800 m. Les prélèvements sont effectués sur la hampe florale au moment de la floraison qui, pour Gentiana burseri Lapeyr., se situe vers la fin du mois de juillet et

pour Gentiana punctata L. vers le début du mois d'août.

4.2. FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DE GENTIANA BURSERI LAPEYR.

Le fractionnement préliminaire CC_1 de l'extrait méthanolique de Gentiana burseri Lapeyr. conduit au chromatogramme suivant:

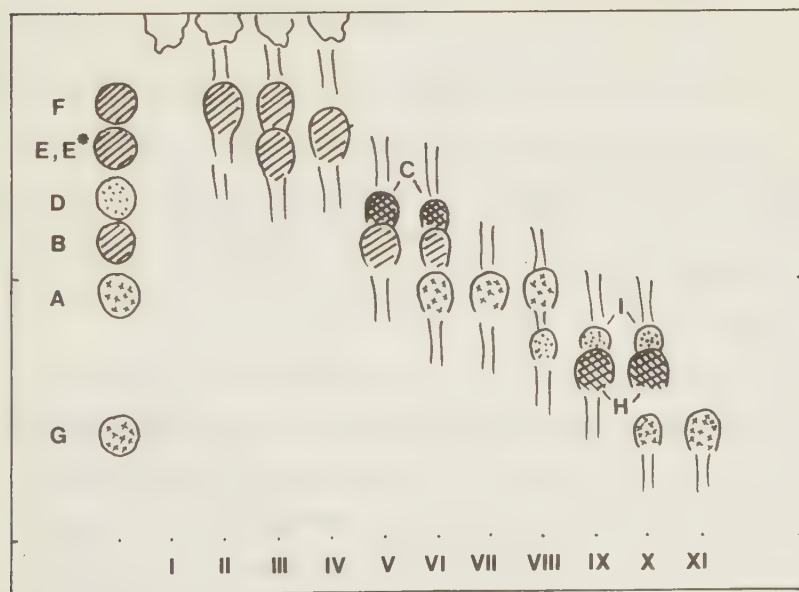


Fig. 4: Chromatogramme des fractions de la colonne CC_1
(fractionnement de 15 g d'extrait méthanolique de
Gentiana burseri Lapeyr.)

<u>Support:</u>	Polyamide MN-DC ₁₁	○ : blanc	⊙ : orange
<u>Solvant:</u>	MeOH 90%	▨ : brun	⊘ : jaune
<u>Révélateur:</u>	KOH2N/MeOH+UV 350 nm	⊗ : vert	

F: Isovitexine-4'-O-β-D-glucoside

E: Isoorientine-4'-O-β-D-glucoside

B: Isovitexine

A: Isoorientine

D, E*, G: Témoins inconnus isolés par Hostettmann [5] ou par
Karangwa [6]

Le chromatogramme nous indique outre la présence des témoins isovitexine-4'-O-β-D-glucoside (F), isoorientine-4'-O-β-D-glucoside (E) [2], isovitexine (B) et isoorientine (A) [1] de structures connues, les substances E* et G mises en évidence par Hostettmann [5], trois autres substances C, H, et I encore non isolées.

La substance C, dont le Rf est voisin de celui de D, présente une coloration verte à la lumière UV 350 nm après révélation, ce qui, à priori, nous permet de conclure à l'absence de la substance D (coloration jaune). En effet, tout au long de nos travaux de séparation, nous n'avons jamais décelé sa présence.

4.2.1. SUBSTANCE E*

Les fractions CC₁ III et CC₁ IV contenant respectivement F, E et E* analysées par CCM fournissent les chromatogrammes I et II, Fig. 5.

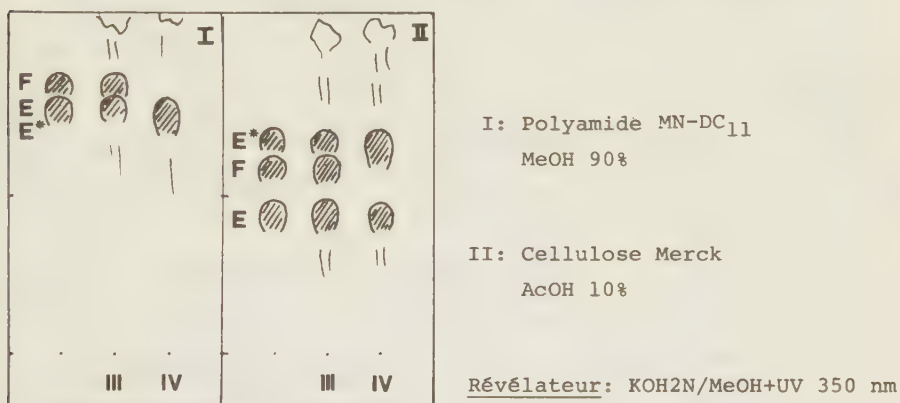


Fig. 5: Chromatogrammes des fractions CC₁ III et CC₁ IV

Les spots E des fractions CC₁ III et CC₁ IV se dédoublent faisant apparaître un autre spot à Rf supérieur correspondant à la substance E*. Cette dernière accuse un Rf voisin de F dans le système chromatographique résolvant le mélange E, E*. Aussi en premier lieu, CC₁ III sera traitée sur polyamide et ensuite réunie à CC₁ IV pour être finalement séparée selon le schéma d'isolement ci-après:

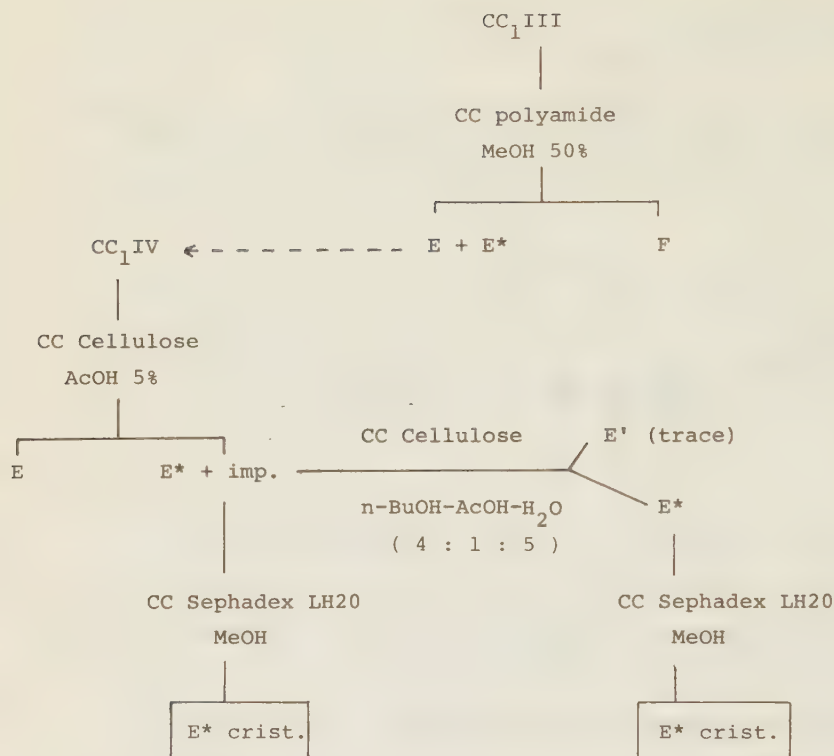


Fig. 6: Schéma d'isolement de E*

Lors de la répétition de l'isolement de E*, nous observons souvent un mélange E* + impuretés dont la purification à travers une colonne de Sephadex LH20 est inefficace. En effet, E* ainsi obtenu ne cristallise pas dans le méthanol. Des analyses par CCM plus approfondies montrent la présence d'une substance en trace seulement visible à la lumière UV 254 nm avant la révélation.

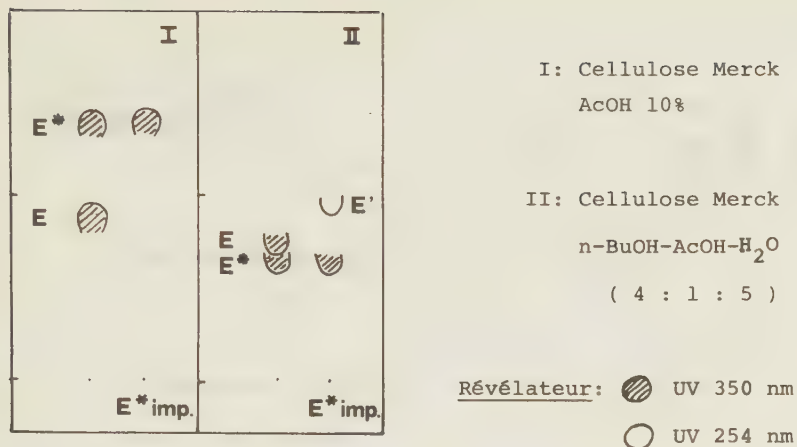


Fig. 7: Analyse de E*

La substance en trace est éliminée du mélange E* + impureté à l'aide d'une colonne de cellulose n-BuOH-AcOH-H₂O (4:1:5).

4.2.2. SUBSTANCE C

L'analyse par CCM des fractions CC₁ V et CC₁ VI contenant respectivement C, B et C, B, A donne les chromatogrammes suivants:

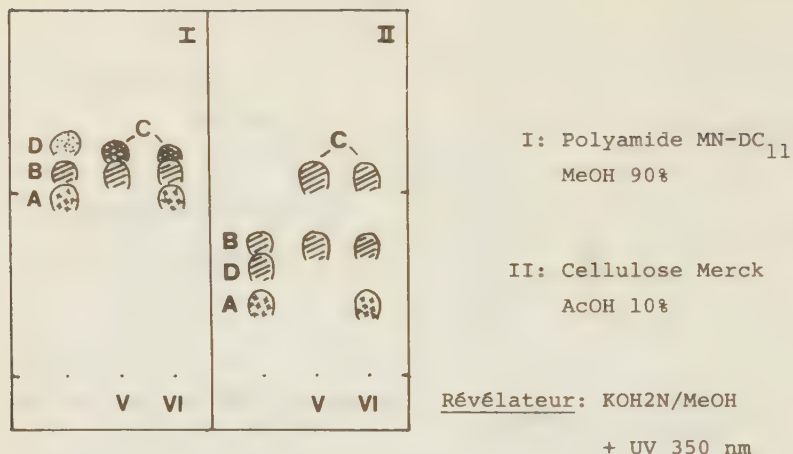


Fig. 8: Chromatogramme des fractions CC₁V et CC₁VI

Les fractions CC₁V et CC₁VI sont réunies et soumises à une séparation sur colonne de cellulose AcOH 10%. La substance C ainsi isolée se présente néanmoins sous la forme d'un spot allongé dans les systèmes chromatographiques I et II. La coloration du spot après révélation avec KOH₂N/MeOH (polyamide - MeOH 90%), n'est pas uniforme mais accuse des nuances de couleur brun-vert. La purification à travers une colonne de Sephadex LH20 n'améliore pas la forme du spot qui suggère l'existence d'un mélange. La recherche systématique d'un système chromatographique susceptible de dédoubler ce spot nous a permis d'obtenir les résultats suivants:

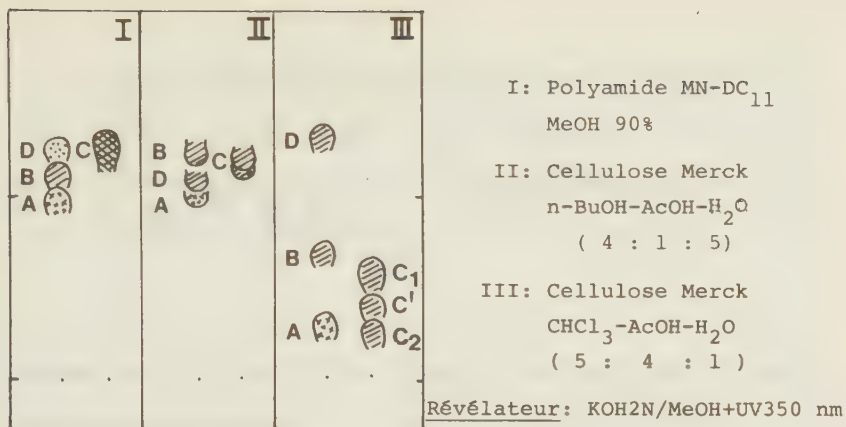


Fig. 9: Analyse du mélange C

Le mélange C est séparé en ses divers constituants C₁, C₂ et C' selon le schéma d'isolement ci-après:

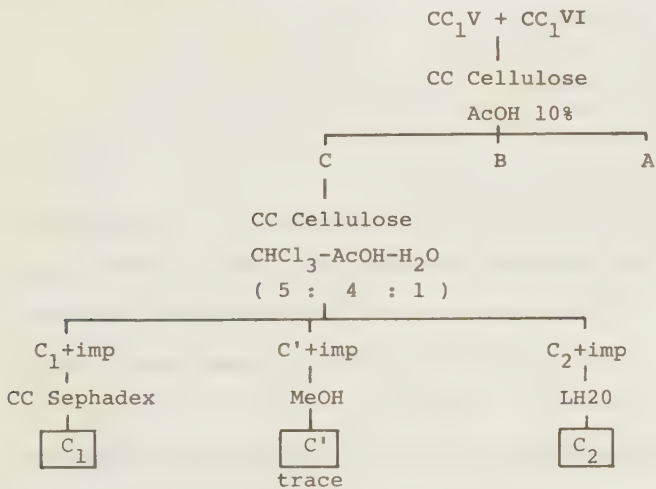


Fig. 10: Schéma d'isolement de C', C₁ et C₂

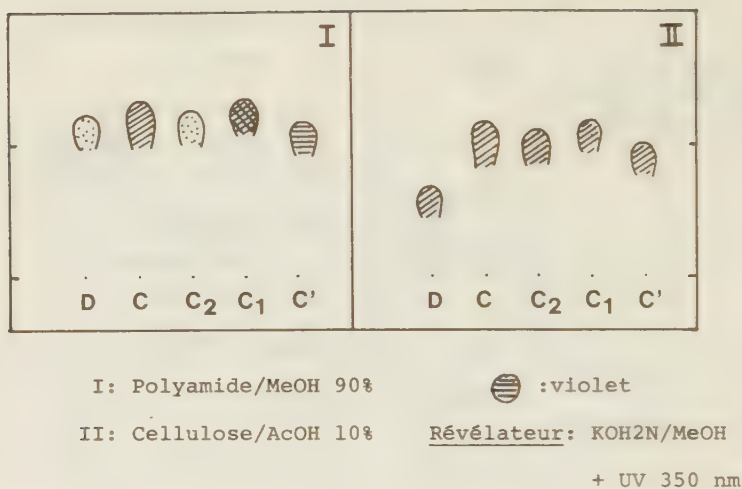


Fig. 11: Comportements chromatographiques de C₁, C₂ et C'

4.2.3. SUBSTANCE G

La fraction CC₁XI contenant la substance G analysée par CCM avec divers systèmes chromatographiques ne révèle qu'un seul spot au contour bien défini et de coloration uniforme après révélation. Ces indices donnent à penser que le spot G ne recèle qu'une seule substance. La fraction citée est donc soumise à une purification à travers une colonne de Sephadex pour éliminer les impuretés.

Cependant, l'hydrolyse acide de G donne 3 spots par CCM, dont l'un en trace. De plus, en émettant l'hypothèse que G

soit une C-glycosyl-hydroxy-5 flavone, il ne doit apparaître que 2 spots par isomérisation. Ces résultats inattendus nous incitent à mener des analyses plus fines pour le contrôle de la pureté de la substance G.

Il s'avère que le système chromatographique polyamide/benzène-MeOH-AcOH (65:32:16) dédouble le spot correspondant à G en un autre spot G' à l'état de trace à valeur Rf supérieur.

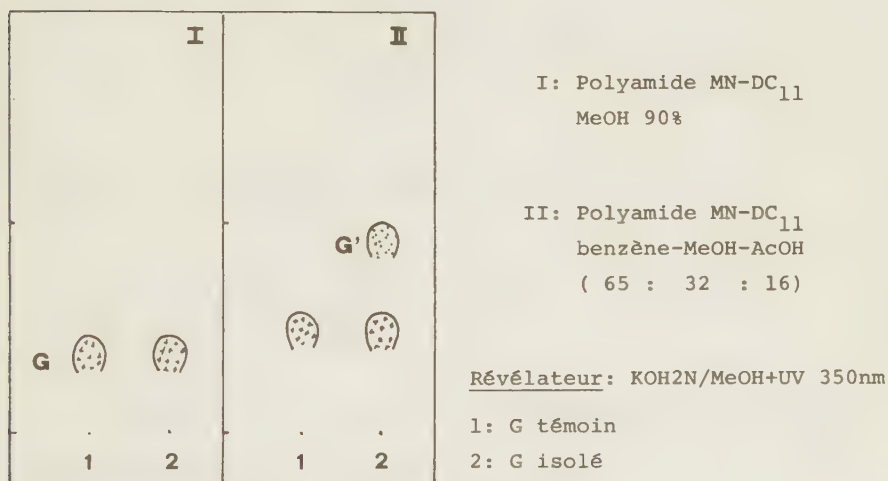


Fig. 12: Analyse de G

Le mélange (G+G') est alors séparé en ses 2 composants selon le schéma d'isolement ci-après:

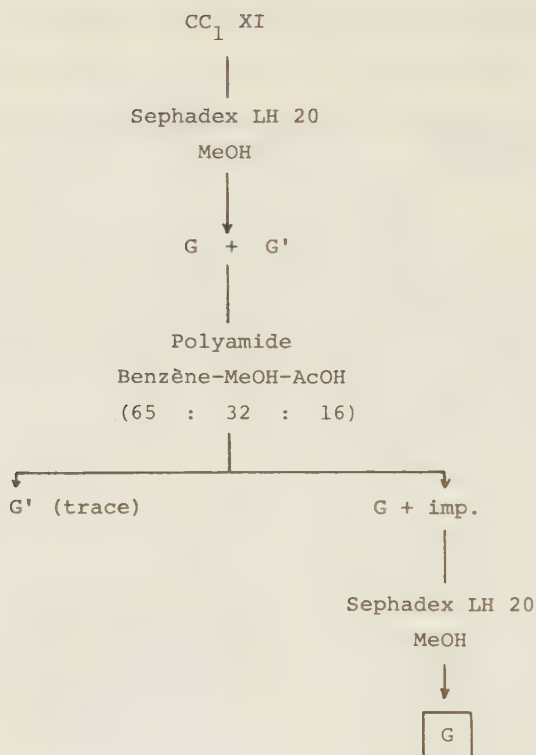


Fig. 13: Schéma d'isolement de G

4.2.4. SUBSTANCES H ET I

L'analyse par CCM des fractions CC_1 IX et CC_1 X mène aux chromatogrammes suivants:

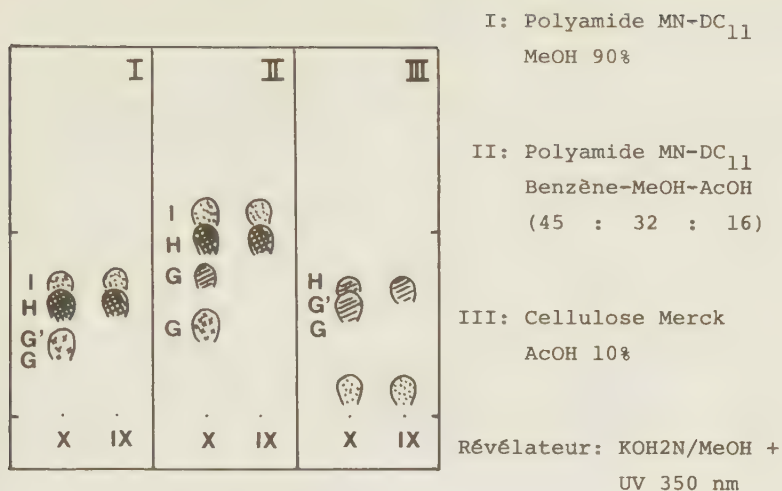


Fig. 14: Chromatogrammes des fractions CC₁ IX et CC₁ X

L'examen de ces 3 chromatogrammes nous montre la voie à adopter pour l'isolement de H et I:

La fraction CC₁ X, tout d'abord, séparée sur colonne de polyamide conduit au mélange H,I qui, réuni avec la fraction CC₁ IX, est ensuite résolu en H et I par une colonne de cellulose:

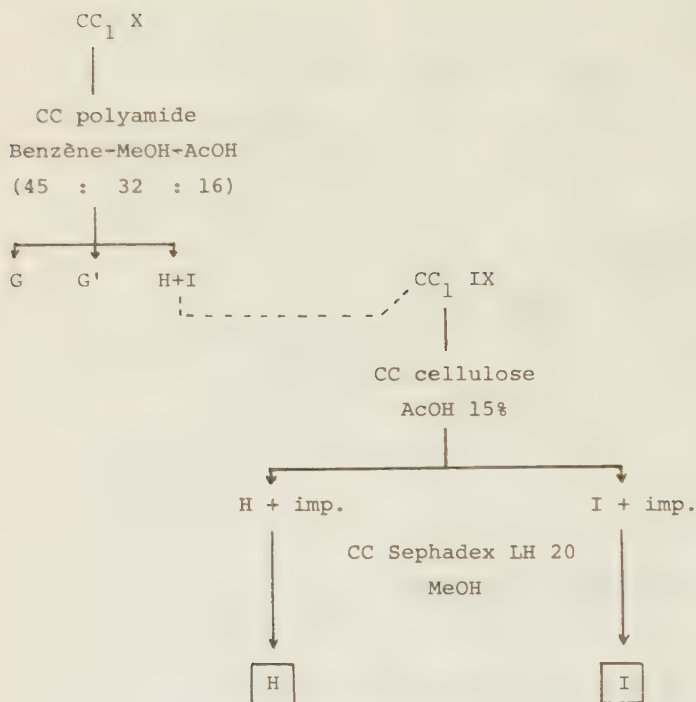


Fig. 14: Schéma d'isolement de H et I

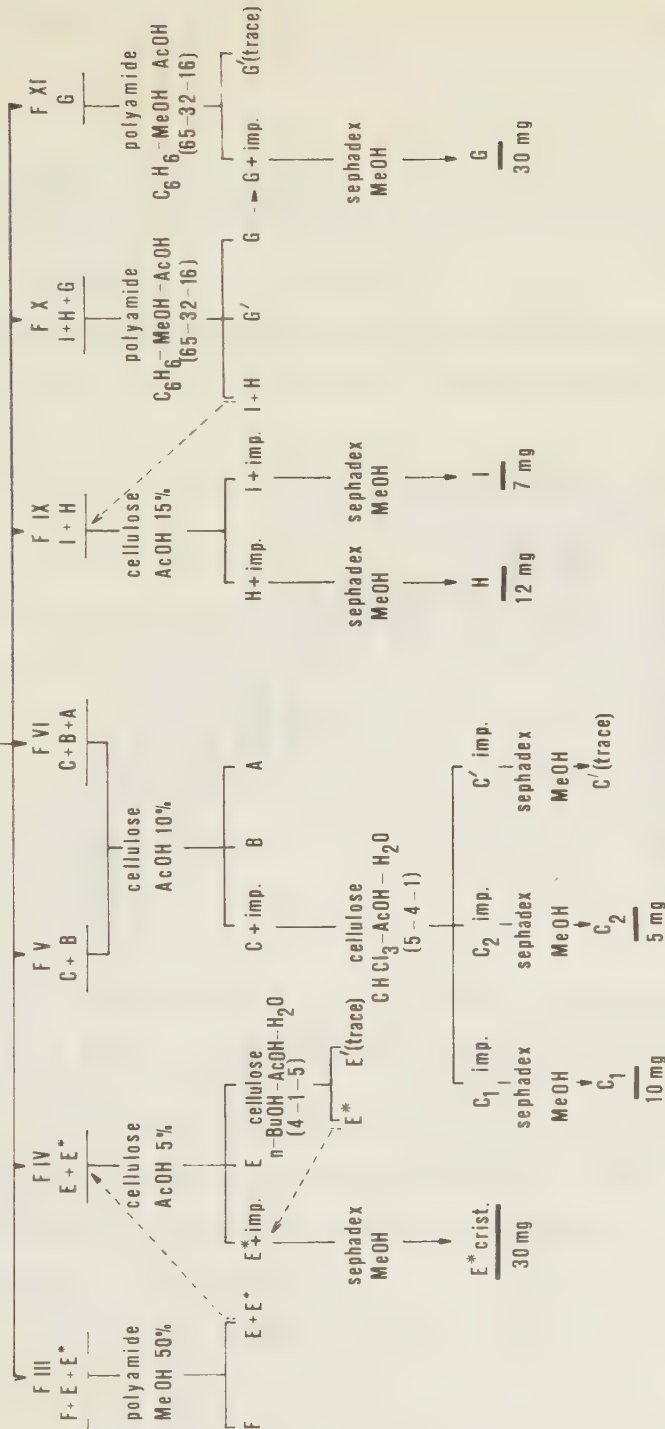


Fig. 15: Schéma général d'isolement des substances de Centiana burseri Lapeyr.

4.3. FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DE GENTIANA PUNCTATA L.

Ce fractionnement préliminaire CC_2 de l'extrait méthanolique de *Gentiana punctata* L. conduit au chromatogramme de la fig. 16:

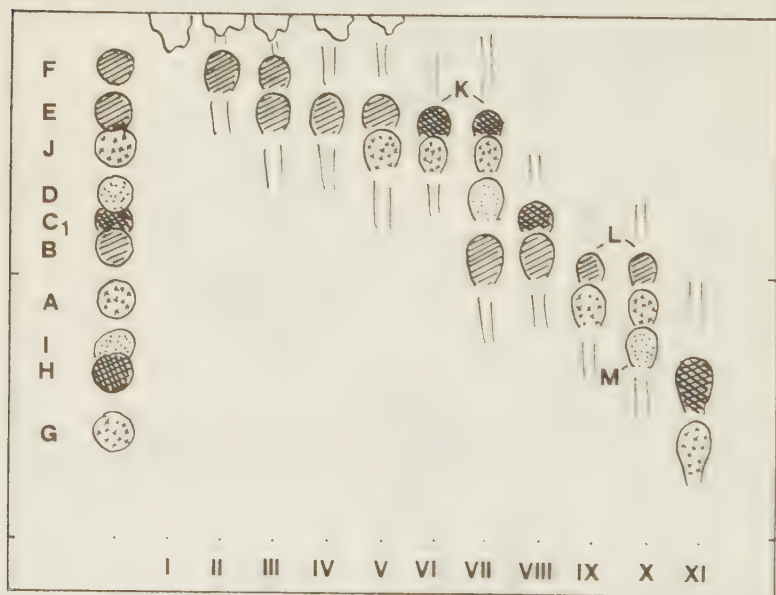


Fig. 16: Chromatogramme des fractions de la colonne CC_2

(15g d'extrait méthanolique de *Gentiana punctata* L.)

Support: Polyamide MN-DC₁₁

Solvant: MeOH 90%

Révélateur: KOH2N/MeOH + UV 350 nm

○ : blanc

◐ : brun

◑ : vert

◒ : orange

◓ : jaune

A: Isoorientine

B: Isovitexine

E: Isoorientine-4'-O- β -D-glucoside

F: Isovitexine-4'-O- β -D-glucoside

J: Isoorientine-2"-O- β -D-glucoside

D: Témoin inconnu

C₁, G, H, I: substances isolées de Gentiana burseri Lapeyr.

Le chromatogramme nous montre outre la présence des témoins isovitexine-4'-O- β -D-glucoside (F), isoorientine-4'-O- β -D-glucoside (E) [2], isovitexine (B), isoorientine (A) [1], isoorientine-4'-O- β -D-glucoside (J) [10] de structure connue, les substances D et G mises en évidence par K. Hostettmann [5], et les substances C₁ et H isolées par nous-même précédemment dans Gentiana burseri Lapeyr. ainsi que trois autres substances K, L, M non encore isolées.

Ces dernières présentent des R_f voisins de ceux des témoins E, B et A; de ce fait, elles sont confondues aisément avec ceux-ci. Cependant la révélation avec une solution alcoolique de potasse (CCM Polyamide/MeOH 90%) différencie nettement K (col. vert) de E (brun) et M (jaune) de A (orange). Par contre, seules les analyses par CCM permettent de distinguer M de I et L de B.

4.3.1. SUBSTANCE D

La fraction CC_2 VII contenant K, J, D et B analysée par CCM donne entre autres les chromatogrammes suivants:

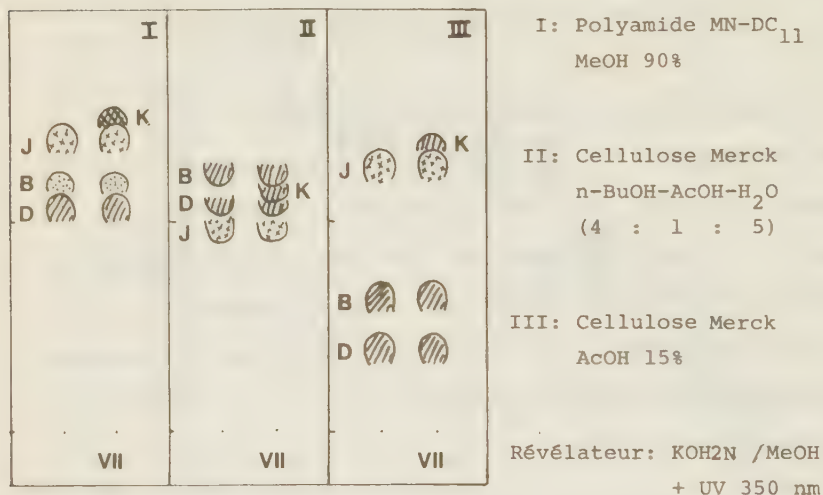


Fig. 17: Analyse de la fraction CC_2 VII

De l'examen des chromatogrammes ci-dessus, il ressort que les systèmes chromatographiques I et III se révèlent les plus aptes à l'isolement de D. Cependant, le système III présente l'avantage de permettre une séparation plus aisée entre la substance B et le mélange K, J qui sera, ultérieurement, recyclé

pour l'isolement des substances K et J. Notre choix se porte donc sur le système chromatographique III.

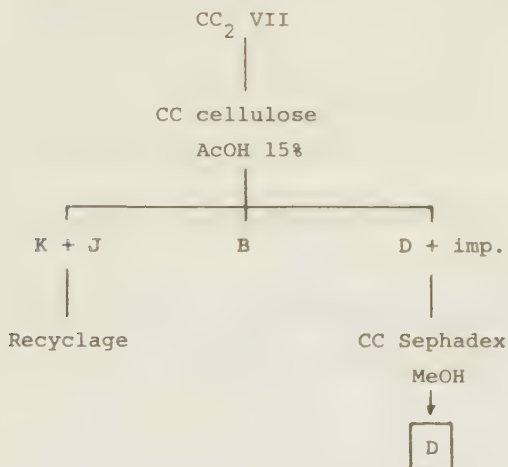
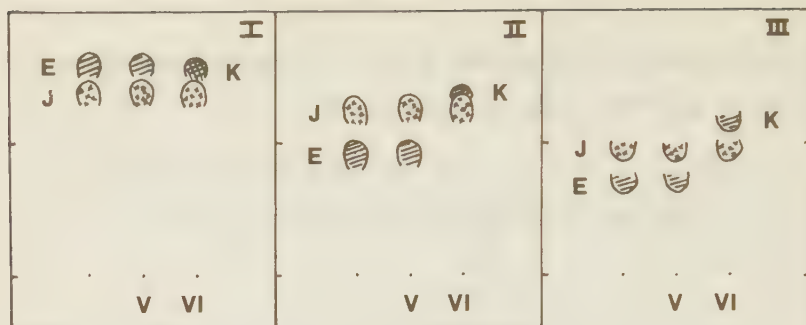


Fig. 18: Schéma d'isolement de D

4.3.2. SUBSTANCES J ET K

Les fractions CC_2 V et CC_2 VI renfermant respectivement E, J et K, J sont soumises à des analyses par CCM conduisant aux chromatogrammes de la fig. 19.



I: Polyamide MN-DC₁₁ MeOH 90%

II: Cellulose AcOH 10%

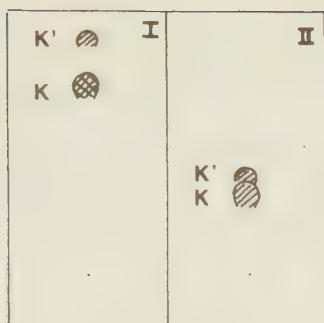
III: Cellulose n-BuOH-AcOH-H₂O (4:1:5)

Révélateur: KOH2N/MeOH + UV 350 nm

Fig. 19: Analyse de CC₂ V et CC₂ VI

Ces analyses nous ont permis de procéder au choix du système chromatographique adapté à la séparation de J et K. Le mélange J, K, obtenu lors de l'isolement de la substance D, est réuni aux fractions CC₂ V et CC₂ VI. Il est ensuite introduit sur une colonne de cellulose dont le développement avec la solution butanolique fournit les substances J et K.

Le contrôle de la pureté de la substance K nous révèle que celle-ci est impure comme le démontrent les chromatogrammes suivants:



I: Polyamide MN-DC₁₁
MeOH 70%

II: Silicagel 60 F 254 Merck
AcOEt-AcOH-H₂O (50:10:7)

Révélateur: KOH₂N/MeOH +
UV 350 nm

Fig. 20: Analyse de la substance K

Les substances K et J pures sont finalement obtenues selon le schéma de séparation suivant:

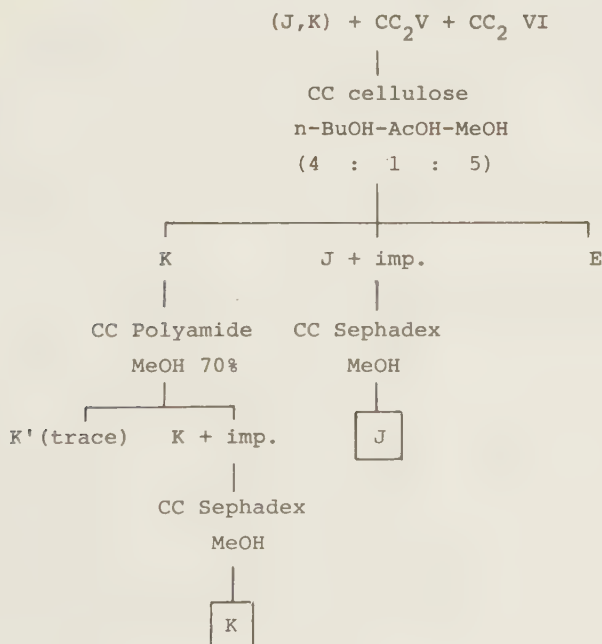


Fig. 21: Schéma d'isolement des substances K et J

4.3.3. SUBSTANCES L ET M

L'analyse par CCM des fractions CC_2 IX et CC_2 X contenant respectivement L, A et L, A, M fournit les chromatogrammes suivants:

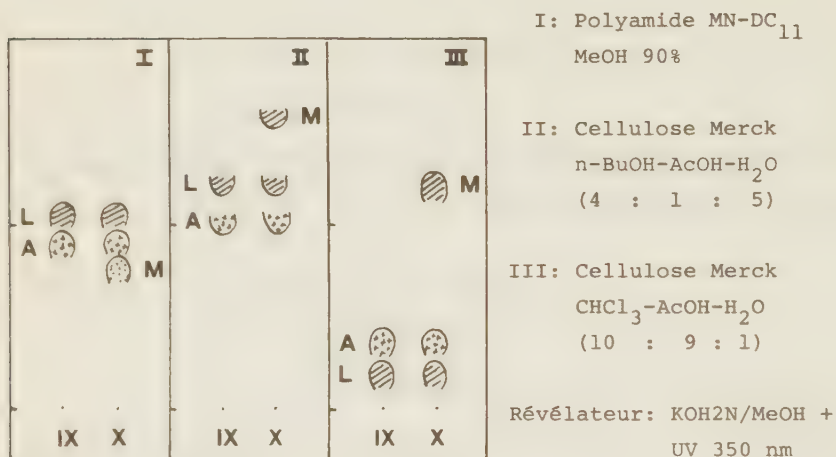
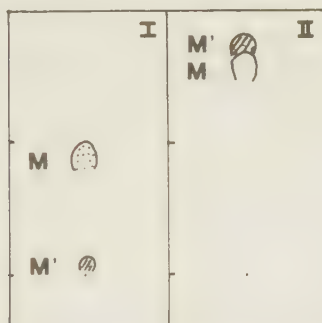


Fig. 22: Analyse des fractions CC_2 IX et CC_2 X

Deux systèmes chromatographiques s'offrent à nous pour mener à bien l'isolement des substances L et M, à savoir les systèmes II et III faisant, tous les deux, intervenir le phénomène de partage. Notre choix est fixé sur le système III pour deux raisons: La première réside dans le fait que le remplissage des colonnes de cellulose avec le solvant aqueux-butanolique

(formation de deux phases) n'est pas chose aisée. La deuxième repose sur le fait que la reproductibilité des séparations effectuées avec le système II nous fait parfois défaut.

La chromatographie sur colonne avec le système III fournit les substances M, L et A. Cependant la pureté de la substance M laisse à désirer, comme le prouvent les chromatogrammes ci-après:



I: Polyamide MN-DC₁₁
MeOH 70%

II: Silicagel 60 F 254 Merck
AcOEt-AcOH-H₂O
(50 : 10 : 7)

Fig. 23: Analyse de la substance M

Les substances M et L sont finalement obtenues selon le schéma ci-dessous:

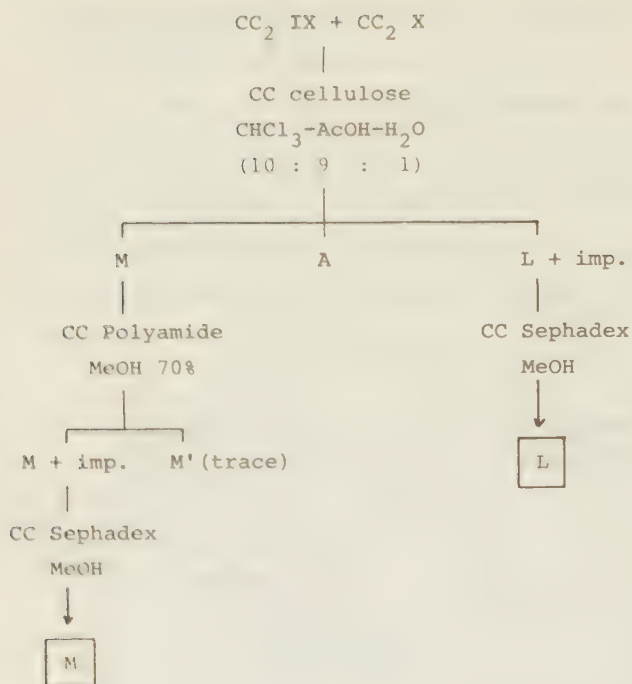


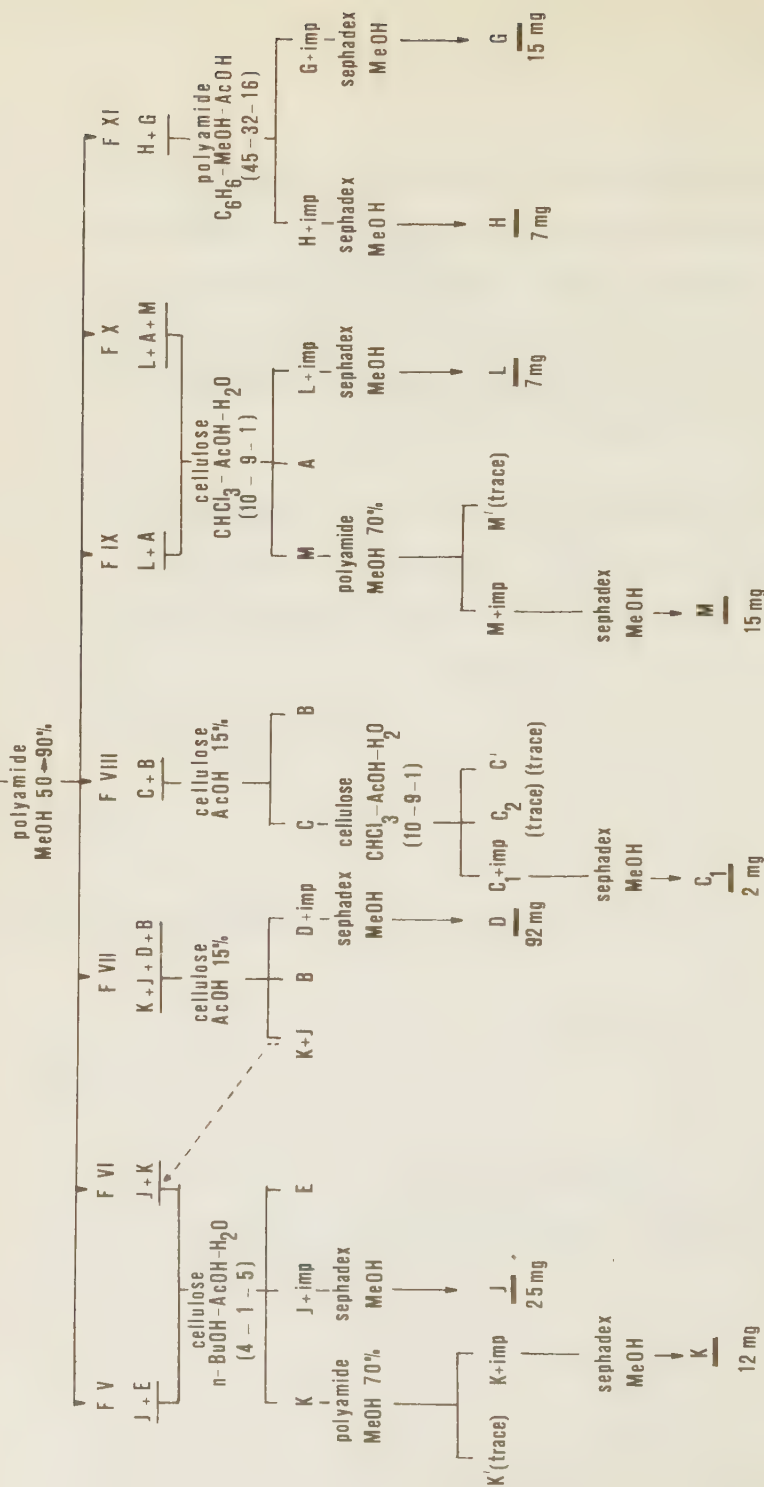
Fig. 24: Schéma d'isolement des substances M et L

4.3.4. SUBSTANCES C_1 , G ET H

Les substances C_1 , G et H ont été isolées par chromatographie des fractions $\text{CC}_2 \text{ VIII}$ et $\text{CC}_2 \text{ XI}$ selon le schéma général d'isolement établi (fig. 25).

La voie d'isolement débouchant à la substance C_1 est similaire à celle adoptée pour Gentiana burseri Lapeyr. (chap. 4.1.2.). Notons que C_2 et C' ont aussi été obtenues, mais à l'état de trace. D'autre part, signalons que, lors de la séparation de G et H, nous n'avons observé ni la présence de la substance I, ni celle de la substance G' .

Les fractions CC_2 II, CC_2 III et CC_2 IV contenant les substances E et F ont été traitées dans le but de déceler la présence et si possible d'isoler la substance E^* . Nos recherches se sont avérées vaines.

Fig. 25: Schéma général d'isolement des substances de *Gentiana punctata* L.

4.4. CRITÈRES DE PURETÉ DES SUBSTANCES

Les substances isolées sont soumises à un contrôle rigoureux de la pureté. Celui-ci est exercé à l'aide des analyses par CCM faisant intervenir plusieurs systèmes chromatographiques, à savoir:

Polyamide MN-DC ₁₁	- MeOH 90%
	- Benzène-MeOH-AcOH (45:32:16)
Cellulose Merck	- AcOH 10%
	- n-BuOH-AcOH-H ₂ O (4:1:5) ph. aqu.
	- CHCl ₃ -AcOH-H ₂ O (10:9:1)
Silicagel 60 F 254 Merck	- AcOEt-MeOH-H ₂ O (50:10:7)

Cependant, ces données analytiques ne doivent être considérées que comme des indices reflétant la pureté probable d'une substance. En effet, il est démesuré de vouloir espérer le contrôle avec tous les systèmes chromatographiques cités dans la littérature. Des indices supplémentaires sont données par le contour et la forme nette du spot ainsi que la coloration uniforme, sans nuance, qu'accuse ce dernier à l'UV avant et après révélation.

La preuve tangible de la pureté d'une substance ne peut être acquise que par l'analyse par CCM des produits d'hydrolyse de la substance elle-même. En effet, l'hydrolyse acide prolongée d'une aglycone flavonique conduit à un seul spot sur couche mince, celle d'un C-glycoside flavonique à deux spots, et celle d'un di-C-glycoside flavonique à deux spots si les restes glycosidiques sont de natures différentes et à un seul spot si ces dernières sont identiques. Quant à l'hydrolyse enzymatique, pour tous les dérivés flavoniques, un seul spot doit être obtenu.

5. IDENTIFICATION ET DETERMINATION DE STRUCTURE DES SUBSTANCES ISOLEES

Les techniques de séparation chromatographiques nous ont permis d'obtenir des substances pures; la pureté étant conditionnée par le seuil de détection de la chromatographie sur couche mince. Il s'agit dès lors de déterminer les structures de ces substances.

La difficulté d'une telle démarche est facilement réduite si la substance à identifier est déjà connue et si de surcroît on dispose d'un échantillon témoin. Dans ce cas simple, quelques milligrammes suffisent pour démontrer qu'il y a identité des propriétés physiques. Dans le cas des substances que nous avons isolées, en l'occurrence des dérivés flavoniques, les critères à vérifier sont les points de fusion ou la décomposition mixtes, la co-chromatographie, le comportement à l'hydrolyse acide et à l'hydrolyse enzymatique, les spectres UV et IR.

La recherche de structure d'une substance nouvelle requiert davantage de produit, car il est indispensable de recueillir de nombreuses données en particulier spectroscopiques. Il est de plus nécessaire de dégrader la molécule selon des voies spécifiques en fragments connus. La nature des produits obtenus ainsi que le type de réactions mises en jeu permettent alors

de reconstituer la structure de la substance nouvelle. Lorsque l'on dispose de suffisamment de produit, aucun problème majeur ne se pose. En revanche, dans le cas contraire, il est nécessaire d'opérer avec discernement un choix parmi les opérations à effectuer afin d'acquérir le maximum de renseignements avec le minimum de produit.

Les réactions de dégradation auxquelles nous avons soumis les substances isolées se résument à des réactions d'hydrolyse en présence de divers catalyseurs.

L'hydrolyse brutale par l'acide iodhydrique libère tous les groupements substitués au squelette flavonique dans la mesure où l'acide provoque la rupture des liaisons carbone-carbone (C-glycosidique) et carbone-oxygène-carbone. Ce traitement, appliqué aux C-glycosylflavones, conduit uniquement à l'aglycone flavonique, les restes osidiques étant détruits. Il est donc possible de savoir s'il s'agit ou non d'un C-glycoside. En effet, puisque la C-glycosylation n'affecte pratiquement pas le spectre UV d'une flavone, la similitude des spectres UV du dérivé flavonique et de son aglycone en apporte la preuve pour autant que leur comportement chromatographique soit différent. Quant aux flavones O-glycosylée et (ou) méthylée, la réaction mène aux flavones hydroxylées correspondantes dont les spectres UV, comparés à ceux des produits de départ, permettent de localiser les sites où s'est effectuée la O-substitution.

L'hydrolyse par l'acide chlorhydrique est plus spécifique puisqu'elle ne touche que les liaisons osidiques classiques (cas des O-glycosylflavones) et les liaisons esters (cas des O-acylflavones). L'avantage marquant qu'elle offre c'est de conserver intact les fragments libérés sauf lorsqu'il s'agit de dérivés des 6 ou 8-C-glycosyl-hydroxy-5-flavones qui, elles, subissent l'isomérisation de Wessely-Moser. L'issue de cette réaction donne des informations quant à la nature C-glycosidique ou (et) O-glycosidique de la substance de départ, ainsi que la nature des restes osidiques. La comparaison des spectres UV du produit initial et ceux des produits d'hydrolyse fournissent aussi des renseignements quant aux positions d'attache des substituants. Une confirmation des sites d'attache est, en outre, fournie par l'analyse des produits issus de l'hydrolyse acide du dérivé méthylé de la substance en question. Les groupes phénoliques étant tous méthylés, l'hydrolyse met à jour un groupe hydroxyle à l'emplacement de la O-substitution, emplacement qui peut être précisé au moyen de la spectrophotométrie UV.

L'hydrolyse par l'enzyme β -D-glucosidase, comme toute réaction enzymatique, est hautement spécifique. Son action s'exerce au niveau des liaisons osidiques classiques uniquement entre les molécules β -D-glucose et la flavone. Comme précédemment, les positions d'attache des restes glucosidiques peuvent être définies.

Les techniques spectroscopiques sont incontestablement des outils de choix dans l'élucidation et la confirmation de structure d'une substance. Des travaux entrepris dans ce domaine, nous pouvons dégager, dans ce qui suit, les données essentielles qui ont contribué à la détermination de structure des substances isolés.

La spectrophotométrie UV qui requiert particulièrement peu de substance est d'un apport non négligeable vu le nombre d'informations que nous pouvons en tirer. Elle fait l'objet d'un certain nombre de travaux dont celui de Mabry et coll. [1]. Il ressort que les dérivés flavoniques présentent deux maximums d'absorption principaux, l'un dans la région spectrale 300-380 nm constituant la bande I et l'autre à 240-280 nm constituant la bande II. La bande I, associée principalement au chromophore cinnamoylé du squelette flavonique, est d'autant plus déplacée vers les grandes longueurs d'onde que le noyau phényle B de la flavone se trouve dans un état d'oxydation élevé. De même, la bande II, associée au chromophore benzoylé, est dépendante du nombre de groupes oxygénés fixés sur le noyau benzénique A. Ainsi, la position des bandes I et II fournit des renseignements sur le schéma d'oxygénation de la flavone. Toutefois, ce sont les déplacements provoqués par les réactifs additionnés à la solution méthanolique de la flavone qui donnent le plus d'informations.

Le réactif chlorure d'aluminium forme trois types de com-

plexes, à savoir, avec le groupe carbonyle et le groupe hydroxyle en 3, avec le groupe carbonyle et le groupe hydroxyle en 5 et avec les groupes hydroxyles en ortho; le deuxième étant détruit par l'acide citrique et le dernier par l'acide chlorhydrique. La présence de groupes o-dihydroxyles sur le cycle B est ainsi détectée par le déplacement hypsochrome de 30-40 nm de la bande I du spectre dans $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ par rapport à celle du spectre dans AlCl_3 . Le déplacement bathochrome de 35-55 nm de la bande I du spectre dans $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ par rapport à celle du spectre dans le méthanol est révélateur d'un groupe hydroxyle en 5. Le méthylate de sodium qui est une base forte, ionise tous les groupes phénoliques. Cependant, un déplacement bathochrome de 40-65 nm sans décroissance de l'intensité de la bande I du spectre obtenu en présence de ce réactif par rapport à la bande I du spectre initial est le signe d'un groupe hydroxyle en 4'. L'acétate de sodium qui est une base plus faible, ionise seulement les groupes phénoliques très acides. L'effet sur la bande II quand un groupe hydroxyle en 7 est présent se traduit par un déplacement bathochrome de 5-20 nm. En résumé, la spectrophotométrie UV permet la détection de groupes hydroxyles en 5, 7 et 4' ainsi que les groupes O-dihydroxyles.

La résonance magnétique nucléaire trouve son importance aussi bien dans la confirmation que dans le fait de compléter des hypothèses de structure élaborées à partir des données four-

nies par la dégradation de la substance. Elle est appliquée soit à la substance pure soit au dérivé triméthylsilylé ou acétylé de la substance.

Le dérivé acétylé est sans doute le plus communément employé; il conduit à un spectre complet dont les signaux sont les plus significatifs. Hillis & Horn [24] et Gentili & Horowitz [14] se sont penchés sur l'étude des dérivés acétylés des C-glycosylflavones par RMN (solvant: CDCl_3):

- Les signaux des groupes acétyles aromatiques relatifs à l'aglycone et aliphatiques relatifs à la partie C-glycosidique sont nettement différenciés: les premiers apparaissent entre δ 2,30 et 2,50 ppm alors que les derniers se situent à des champs plus élevés entre δ 1,67 et 2,10 ppm.
- Sur la base des signaux des groupes acétyles aliphatiques, il est possible de distinguer un 8-C-glucoside flavonique de son isomère en 6. En effet, les protons des groupes acétyles 2" et 6" d'une 8-C-glucosyl flavone acétylée résonnent respectivement entre δ 1,70 - 1,73 ppm et δ 1,90 - 1,95 ppm, alors que ceux d'une 6-C-glucosylflavone acétylée donnent des signaux se situant respectivement entre δ 1,77 - 1,83 ppm et δ 2,00 - 2,04 ppm. Quant aux groupes acétyles 3" et 4", ils apparaissent à des champs inférieurs respectivement à δ 2,01 - 2,03 ppm et δ 2,08 - 2,10 ppm pour les isomères en 8 et à δ 2,05 - 2,08 ppm pour les isomères en 6.

- Les protons aromatiques de l'aglycone produisent des signaux qui s'étalent entre δ 6,80 - 7,90 ppm à l'exception du proton en 3 qui donne un singulet caractéristique entre δ 6,55 - 6,70 ppm.
- Les protons aliphatiques sont représentés par des signaux entre δ 3 et 6 ppm dont celui du proton anomérique H-1" qui apparaît sous forme d'un doublet aux environs de δ 5 ppm. Sa grande constante de couplage $J=10\text{Hz}$ (couplage axial-axial) est révélatrice d'une configuration pour l'ose de la série D et la petite constante de couplage $J=2\text{Hz}$ (couplage équatorial-axial) est relative à la configuration .

La spectrophotométrie IR fournit "l'empreinte digitale" de la substance; elle est donc très utile dans le processus d'identification d'une substance. Néanmoins, son intérêt réside aussi dans la révélation des groupes fonctionnels que comporte la flavone, notamment le groupe carbonyle conjugué. Les dérivés hydroxy-5 flavoniques montrent dans le domaine des fréquences $1600 - 1650\text{ cm}^{-1}$ deux bandes d'absorption; celle à grande fréquence $1645 - 1650\text{ cm}^{-1}$ est communément attribuée à l'absorption du groupe carbonyle chélaté et l'autre $1610 - 1620\text{ cm}^{-1}$ à l'absorption de la double liaison. Récemment, José et coll. [25] ont étudié l'effet de l'iode sur l'intensité d'absorption de la double liaison et l'effet du trifluorure de bore sur les fréquences du groupe carbonyle des dérivés hydroxy - 5 flavoniques.

Les résultats montrent que la bande à 1650 cm^{-1} est due à l'absorption $\text{C}=\text{C}$ et celle à 1620 cm^{-1} à l'absorption $\text{C}=\text{O}$.

5.1. SUBSTANCES DANS GENTIANA BURSERI LAPEYR.

Rappelons que dans cette espèce, nous avons mis en évidence six substances à savoir C_1 , C_2 , E^* , G , H et I dont les structures sont à déterminer.

5.1.1. SUBSTANCE G

Le spectre UV de G dans le méthanol présente deux bandes principales d'absorption, l'une à 272 nm (bande II) et l'autre à 337 nm (bande I). Ces deux bandes se situent dans les régions spectrales (bandes I= $304\text{--}350\text{ nm}$, bande II= $240\text{--}280\text{ nm}$) [11] caractéristiques des composés flavoniques.

L'effet bathochrome (8 nm) de NaOAc sur la bande II signale un groupe hydroxyle en position 7, celui (47 nm) de NaOMe sur la bande I, sans décroissance de l'intensité, révèle un groupe hydroxyle en 4'.

La bande I dépend essentiellement du chromophore cinnamoyle affectant le groupe phényle B et l'hétérocycle C. De ce fait, la position de la bande I nous renseigne sur l'état d'oxydation

du cycle B. Par comparaison avec les valeurs de la littérature (voir tableau 1), la substance G serait soit hydroxylée en 4' (isovitexine, 336 nm) soit hydroxylée en 4' et O-substituée en 3' (isoorientine-3'-O-glucoside, 339 nm); donc ne portant pas de groupe o-dihydroxyle sur le noyau phényle.

Des anomalies surgissent dans le spectre effectué en présence de AlCl_3 . En effet, dans la région des grandes longueurs d'ondes, deux bandes absorbent, l'une à 380 nm et l'autre à 420 nm, au lieu d'une seule bande (éventuellement précédée d'un épaulement Ia) généralement observée pour les composés flavoniques. Ces dernières correspondent à deux complexes du type AlCl_3 -O-dihydroxyle puisqu'ils sont détruits par l'action de HCl pour donner naissance à une autre bande Ib à 343 nm, précédée d'un épaulement Ia à 384 nm. L'écart de 47 nm observé entre le maximum Ia du spectre AlCl_3/HCl et le maximum I du spectre dans le méthanol témoigne de la présence d'un complexe non détruit par HCl, celui qui fait intervenir la fonction carbonyle et l'hydroxyle en position 5. Les deux groupes O-dihydroxyle ne peuvent être présents sur le noyau A de la flavone, car, dans ce cas, la substance G serait décomposée par NaOMe; or elle ne l'est pas. (Exemples: la baicaléine, trihydroxy-5,6,7 flavone; la baicaline, dihydroxy-5,6-O-glucuronosyloxy-7 flavone; la norwogonine, trihydroxy-5,7,8 flavone). Ils sont forcément greffés sur le noyau B, ce qui est en contradiction avec l'information donnée par la position de la bande I du spectre de G dans le méthanol.

Cette contradiction ainsi que l'anomalie observée précédemment nous incitent à formuler l'existence, dans la structure de G, d'un chromophore additionnel autre que les chromophores cinnamoyle, benzoyle et pyrone propres au squelette flavonique.

En résumé, nous retiendrons pour la substance G la structure probable d'une tétrahydroxy-5,7,3',4' flavone en ce qui concerne le squelette flavonique, squelette auquel est greffé un reste porteur d'un groupe O-dihydroxyle et absorbant dans l'UV.

Tableau 2: Bande I des spectres UV dans le méthanol de quelques flavones à cycle B oxygéné

Flavones		Schéma de substitution							Bande I (nm)
		Noyau A				Noyau B			
5	6 ^{a)}	7	8	3'	4'	5'			
Chrysine	[11]	OH		OH				313	
	[18]	OH		OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	327	
Isovitexine-4'-O-gluc.	[2]	OH	C-gluc	OH			O-gluc	326	
Isocytisoside	[12]	OH	C-gluc	OH			OCH ₃	326	
	[11]	OH		OH		OCH ₃	OCH ₃	331	
Isoorientine-4'-O-gluc.	[2]	OH	C-gluc	OH		OH	O-gluc	335	
Isovitexine	[11]	OH	C-gluc	OH			OH	336	
	[11]	OH		OH		OCH ₃	OCH ₃	340	
Isoorientine-3'-O-gluc.	[23]	OH	C-gluc	OH		O-gluc	OH	339	
Isoscoparine	[13]	OH	C-gluc	OH		OCH ₃	OH	344	
Tricine-6-C-gluc.	[16]	OH	C-gluc	OH		OCH ₃	OH	347	
Isoorientine	[11]	OH	C-gluc	OH		OH	OH	349	
Selagine	[17]	OH		OH		OH	OH	350	
Isoaffinetine	[27]	OH	C-gluc	OH		OH	OH	351	

a) La C-glycosylation n'affecte pratiquement pas la bande I

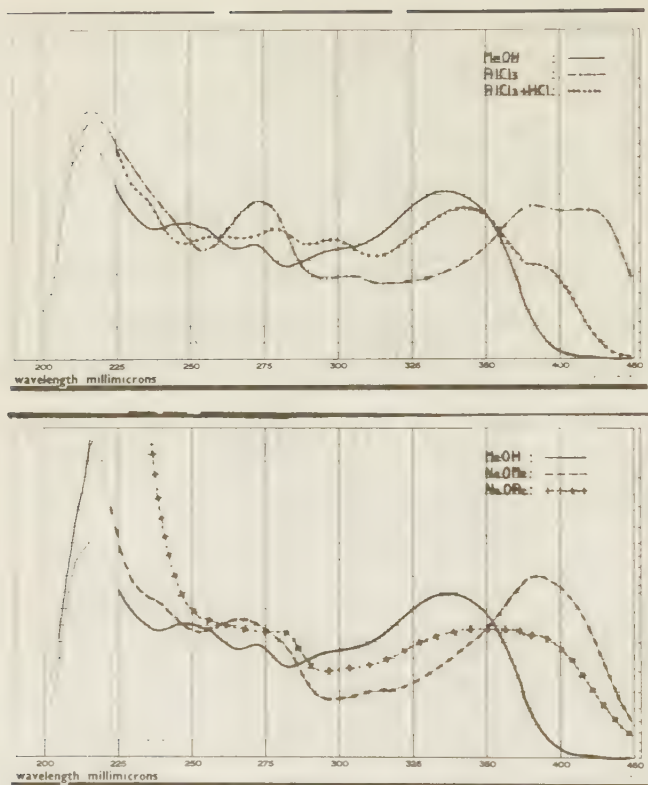
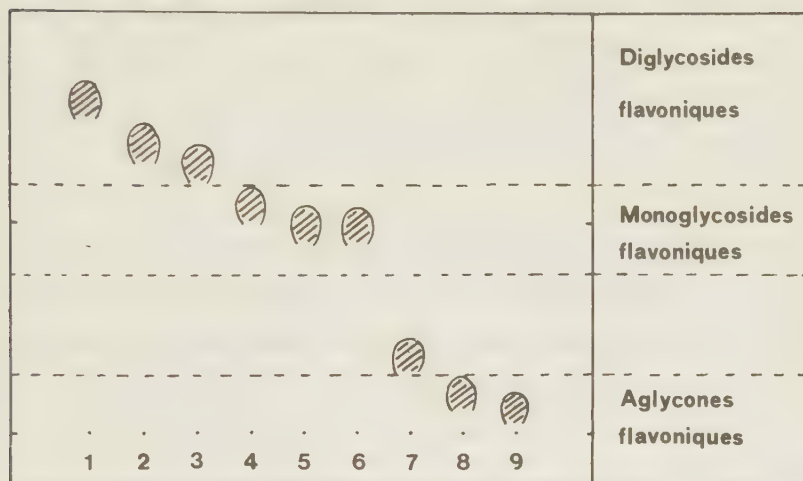


Fig. 28: Spectres UV de G

Tableau 3: Relevé des spectres UV de G

Réactifs	Maximums (nm)				
MeOH	250	272	296sh	337	
NaOMe	267	280sh	310sh	384	
NaOAc		280	302sh	354	
AlCl ₃		274	303sh	380	420
AlCl ₃ /HCl		279	298	343	384sh

Le comportement chromatographique de G sur couche mince de polyamide nous permet d'émettre quelques hypothèses quant à la structure de celle-ci.



Polyamide MN-DC₁₁ - MeOH 90%

	<u>R_f</u>		<u>R_f</u>
1: Isovitexine-4'-O-glucoside	0,77	6: Lutéoline tétraméthylé	0,5
2: Isoorientine-4'-O-glucoside	0,73	7: Substance G	0,19
3: Isoorientine-2"-O-glucoside	0,65	8: Apigénine	0,1
4: Isovitexine	0,55	9: Lutéoline	0,07
5: Isoorientine	0,50		

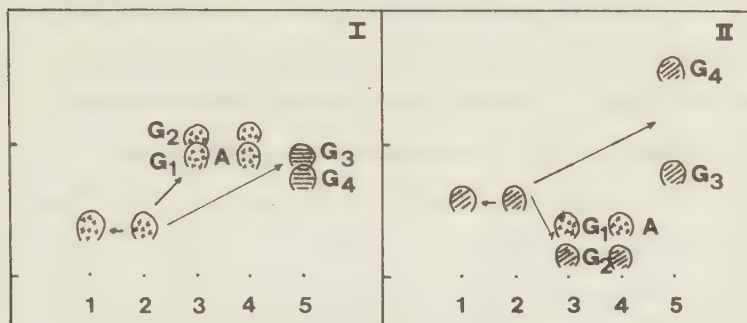
Fig. 29: Comportement chromatographique de quelques dérivés flavoniques

La substance G ($R_f=0,19$, polyamide-MeOH 90%) se trouve dans la zone intermédiaire entre celle des aglycones flavoniques et celle des monoglycosides flavoniques. La structure de G est un compromis entre les deux structures précitées, compromis qui doit tenir compte du fait que les groupes hydroxyles aromatiques abaissent le R_f d'une substance et que les restes glycosidiques augmentent le R_f ainsi que les groupes méthoxyles aromatiques mais dans une moindre mesure.

Selon les informations tirées des spectres UV, G serait une tetrahydroxyflavone du type de la lutéoline. Cependant la valeur R_f de G n'est pas compatible avec une telle structure. La concordance entre spectres UV et R_f n'est réalisée que si le substituant de la flavone porte soit deux ou trois groupes méthoxyles aromatiques soit deux ou trois groupes hydroxyles aromatiques compensés par un reste glycosidique fixé sur le substituant lui-même ou sur le squelette flavonique.

La dégradation de G par l'enzyme β -glucosidase et par l'acide chlorhydrique dilué nous renseignera respectivement sur la nature O-glucosidique terminale et O-glucosidique substituée de G.

Les hydrolysats sont fractionnés en extraits étherés, butanoliques et aqueux, lesquels sont analysés par CCM.



I: Polyamide MN-DC₁₁

MeOH 90%

☉ : fluorescence bleu clair

à 350 nm

II: Cellulose Merck

AcOH 10%

Révéléateur: KOH2N/MeOH +

UV 350 nm

1: G hydrolyse enzymatique, extrait butanolique

2: G

3: G hydrolyse acide, extrait butanolique (G₁, G₂) purifié

4: Isoorientine (A) + Orientine

5: G hydrolyse acide, extrait étheré (G₃, G₄)

Fig. 30: Chromatogramme de G hydrolysé

Les analyses négatives de l'extrait aqueux (sucre) relatif à l'hydrolyse acide et l'extrait butanolique relatif à l'hydrolyse enzymatique infirment la nature O-glycosidique de G puisqu'aucun sucre n'est libéré après l'action de HCl et que G reste in-

tact (CCM, spectres UV) après l'action de l'enzyme. Par contre, la confirmation de la nature C-glucosidique de G est établie par la libération, dans la phase butanolique de l'hydrolyse acide, de deux substances G_1 et G_2 correspondant respectivement à l'isoorientine et à son isomère orientine (co-chromatographie, spectres UV). Au préalable, nous avons effectué une pseudo-cinétique de l'hydrolyse acide de G. Après 15 mn et 30 mn de chauffage, nous opérons des prélèvements, lesquels sont fractionnés et analysés par CCM. Nous observons, après 15 mn de chauffage, la formation de G_1 et à 30 mn celle de G_2 : G_1 s'est isomérisé selon le processus de Wessely-Moser [19].

G_1 est donc un dérivé de l'isoorientine (lutéoline-6-C- β -D-glucoside).

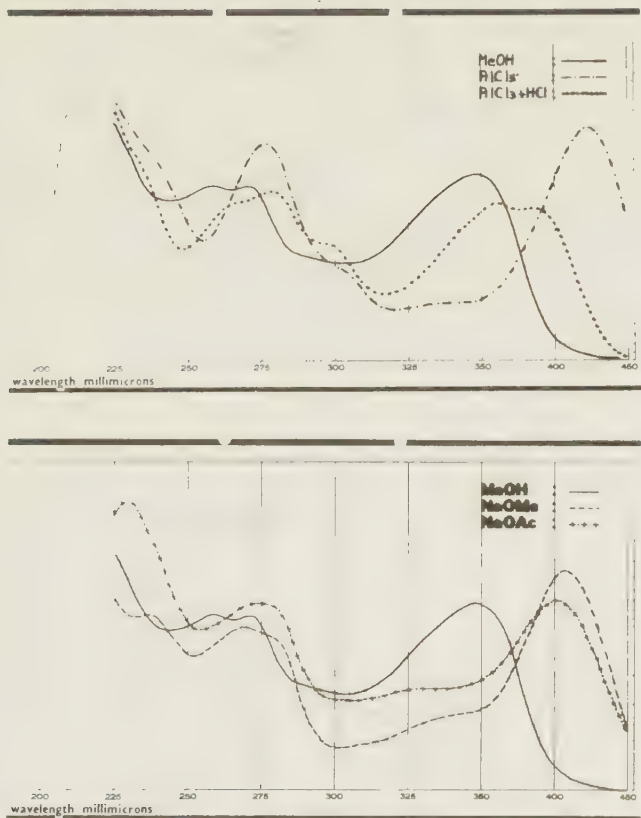


Fig. 31: Spectres UV de G_1 et G_2

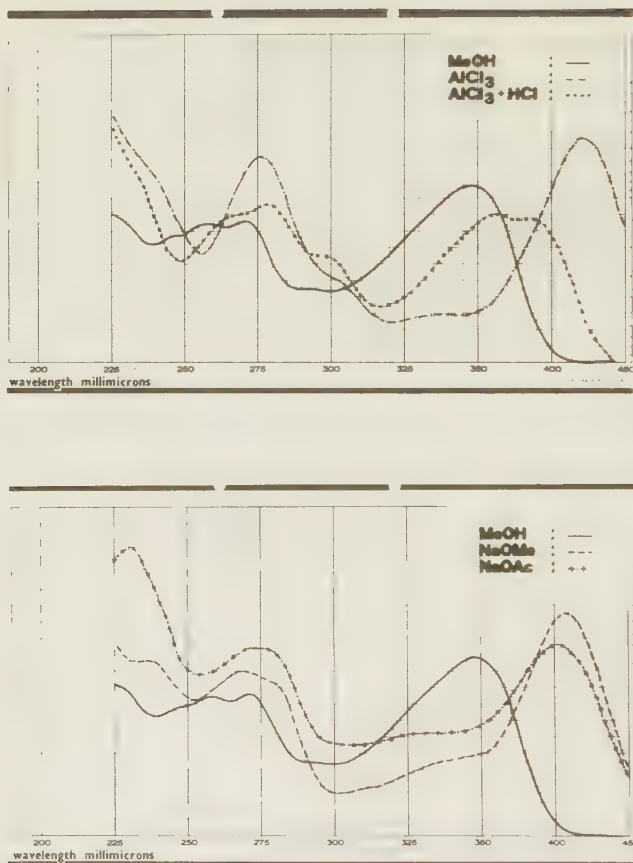


Fig. 32: Spectres UV de isoorientine + orientine¹⁾

- 1) Aucune différence notable n'est observée entre les spectres de l'isoorientine et ceux du mélange équimolaire isoorientine-orientine

Tableau 4: Relevé des spectres UV de G_1 et G_2 et de l'isoorientine isomérisée

Réactifs	Maximums (nm)				
<u>G₁ + G₂:</u>					
MeOH	258	271			348
NaOMe	270	278sh		335sh	404
NaOAc	272	278sh		325sh	400
AlCl ₃		277	303sh	335sh	422
AlCl ₃ /HCl	265sh	280	300sh	360	388sh
<u>Isoorientine isomérisée</u>					
MeOH	258	272			350
NaOMe	270	278sh		335sh	406
NaOAc	272	278sh		325sh	402
AlCl ₃		277	303sh	333sh	424
AlCl ₃ /HCl	265sh	279	300sh	360	388sh

La présence dans l'extrait étheré de l'hydrolyse acide de deux substances G_3 et G_4 ainsi que la différence de Rf constatée entre G et G_1 confirment, une fois de plus, l'existence d'un substituant hydrolysable dans la molécule G, substituant auquel s'identifient G_3 et G_4 . Le comportement sur couche mince de G prévoit, pour ces derniers, une nature polyphénolique; celui de G_1 renforce cette hypothèse. En effet, les O-glycosides de C-glycosides flavoniques libèrent, par hydrolyse acide, des restes glucidiques (molécule produisant une augmentation de Rf) et, de ce fait, voient leur Rf baisser. Dans le cas présent, aucun sucre n'est détecté par CCM (révélateurs: phtalate d'aniline et phtalate de p-anisidine) et une augmentation de Rf est observée. Ce changement de Rf ne s'explique que par la rupture de molécule provoquant une diminution de Rf de la molécule avant hydrolyse.

Parmi les polyphénols susceptibles de se substituer sur un squelette flavonique, nous relevons l'existence des acides phénoliques (cas des flavones acylées) et des flavonoïdes (cas des biflavonoïdes). Afin d'avoir une idée sur l'acidité de G_3 et G_4 , l'extrait étheré est soumis à une purification selon le schéma établi ci-après:

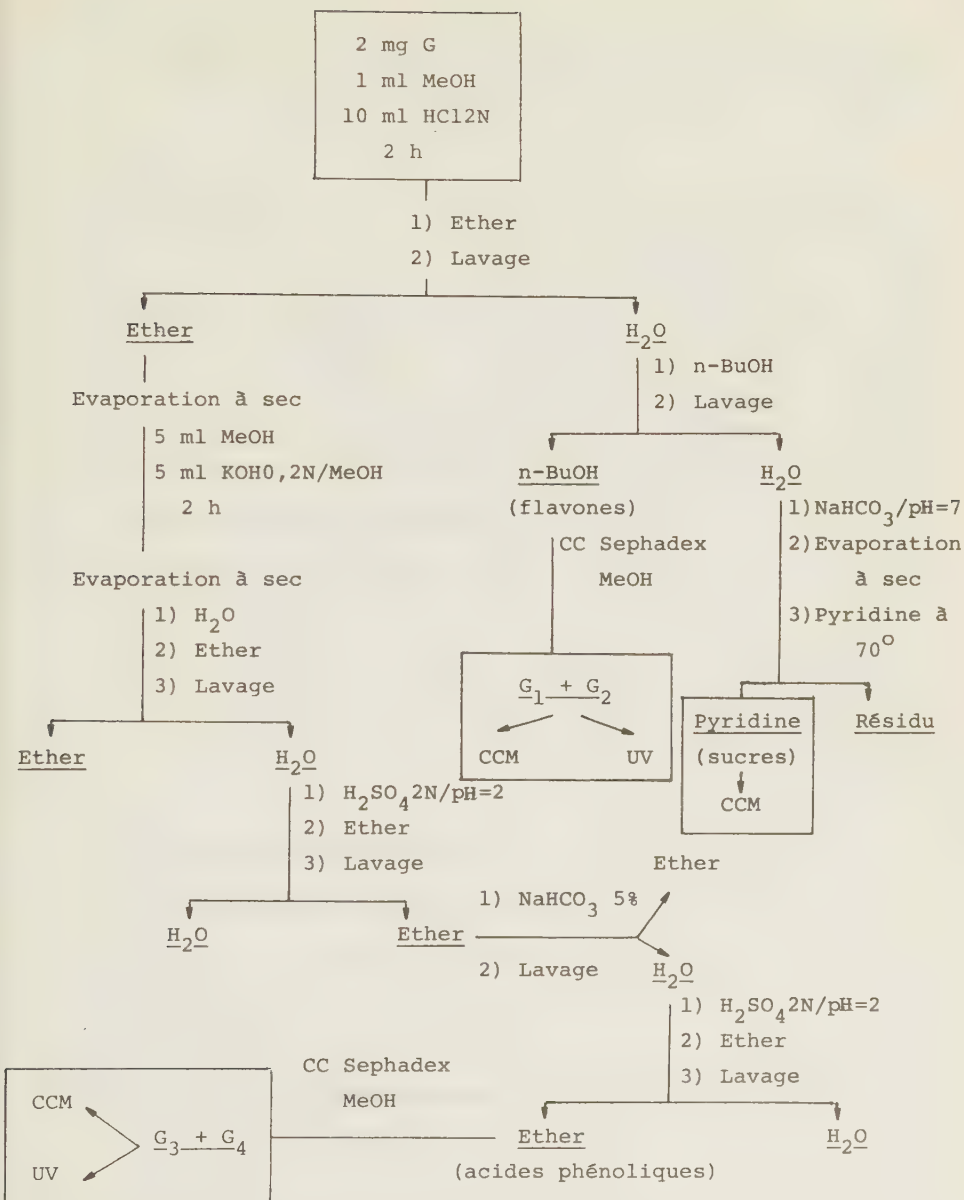


Fig. 33: Schéma de séparation des produits d'hydrolyse acide de G

Les substances G_3 et G_4 , extraites par le bicarbonate, présentent donc un caractère acide.

Les acides phénoliques répandus dans la nature dérivent soit de l'acide benzoïque tels que les acides p-hydroxybenzoïque, gentisique, protocatéchique et gallique, soit de l'acide cinnamique tels que les acides p-coumarique, caféique, férulique et sinapique [20]. A priori, une sélection parmi les acides mentionnés peut être opérée en se basant sur leur comportement vis à vis de la lumière UV 360 nm. En effet, les quatre acides cinnamiques et l'acide gentisique (acide dihydroxy-2,5 benzoïque) présentent une fluorescence [20] qui est aussi observée pour les substances G_3 et G_4 . L'acide gentisique est éliminé du choix puisqu'il ne présente qu'un seul spot par CCM cellulose-AcOH alors que les acides cinnamiques produisent chacun deux spots correspondant aux isomères cis et trans^{*)}.

Les analyses par CCM et les spectres UV révèlent que G_3 et G_4 sont les isomères cis-trans de l'acide caféique.

^{*)} Les acides cis et trans cinnamiques s'isomérisent en mélange cis-trans par traitement en milieu acide [21] [22] [26]

Tableau 5: Caractéristiques chromatographiques du reste
phénolique de G (G_3 , G_4)

Acides	Système chro- matographique	Rf	Coloration					
			UV 350nm	Révélateur				
				A A+ Na ₂ CO ₃	B	B+Na ₂ CO ₃		
G ₄ - G ₃	1	0,70-0,29	j	br	j	v-cl	g-br	
Ac.caféique cis-trans	1 ¹⁾	0,72-0,31	j	br	j	v-cl	g-br	
G ₄ - G ₃	2	0,44-0,38	bl-cl	br	br	p	p	
Ac.caféique cis-trans	2 ²⁾	0,39-0,46	bl-cl	br	br	p	p	
G ₄ - G ₃	3	0,38	bl-cl	br	br	br-j	br	
Ac.caféique cis-trans	3 ²⁾	0,38	bl-cl	br	br	br-j	br	
	4	0,15-0,35	bl-cl	br	br	br-j	br	

1: Cellulose Merck/AcOH 2%

2: Polyamide MN-DC₁₁/MeOH 90%

3: Silicagel 60 F 254 Merck/Benzène-MeOH-AcOH (45:8:3)

4: Silicagel 60 F 254 Merck/Toluène-AcOEt (3:10)

A: p-nitraniline diazotée [20]

B: 4-nitro-o-anisidine diazotée (Echtrotsalz B, Fluka)

bl: bleu cl: clair v: violet br: brun

j: jaune p: pourpre g: gris

1) Les acides cinnamiques s'isomérisent in situ dans le système chromatographique cellulose-AcOH [21] [22]

2) Acide caféique isomérisé

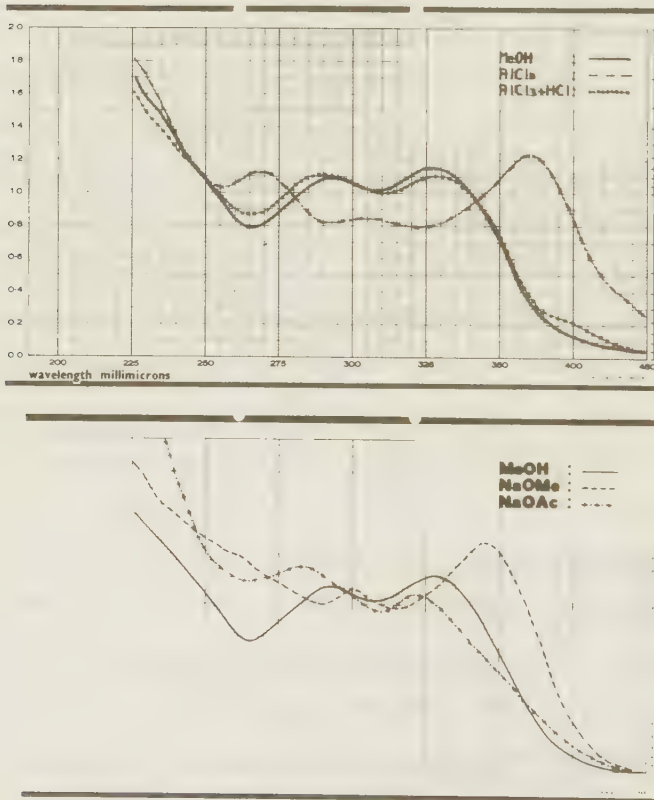


Fig. 34: Spectres UV de G_3 et G_4

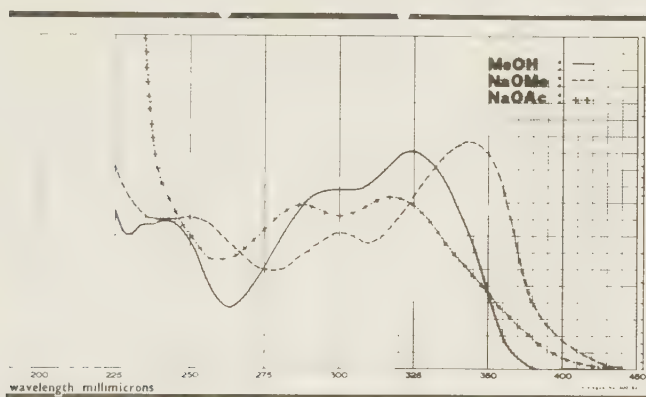
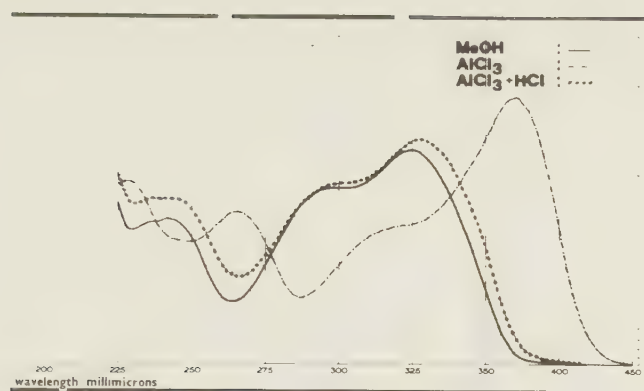


Fig. 35: Spectres UV de l'acide caféique isomérisé (cis-trans)

Tableau 6: Relevé des spectres UV de G_3 et G_4 et de l'acide
caféique isomérisé

Réactifs	Maximums (nm)		
$\frac{G_3 + G_4}{4}$			
MeOH		293	326
NaOMe		303	345
NaOAc		283	320
AlCl ₃	268	305sh	370
AlCl ₃ /HCl		290	328
<u>Acide caféique isomérisé</u>			
MeOH		295	324
NaOMe		303	343
NaOAc		288	319
AlCl ₃	267	315sh	374
AlCl ₃ /HCl		293	326

L'identité de G_3 et G_4 est vérifiée par les données analytiques des dérivés méthylés (diazométhane) et silylé (HMDS/TMCS), données fournies par le couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (CG/SM).

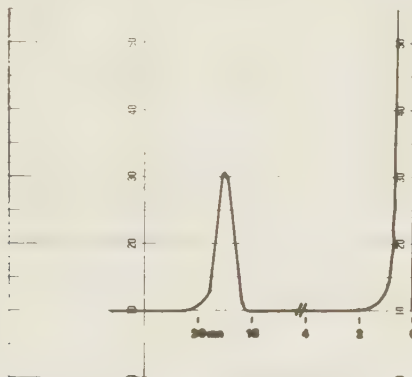


Fig. 36: Chromatogramme de (G_3+G_4) méthylé

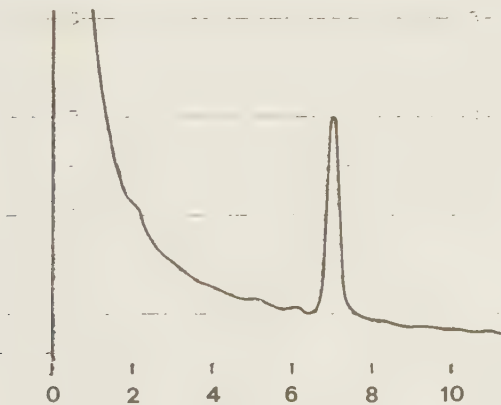


Fig. 37: Chromatogramme de (G_3+G_4) silylé

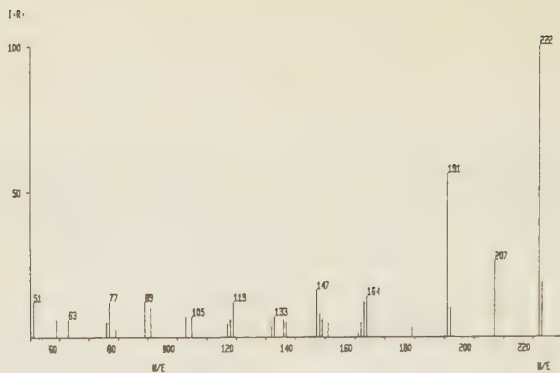
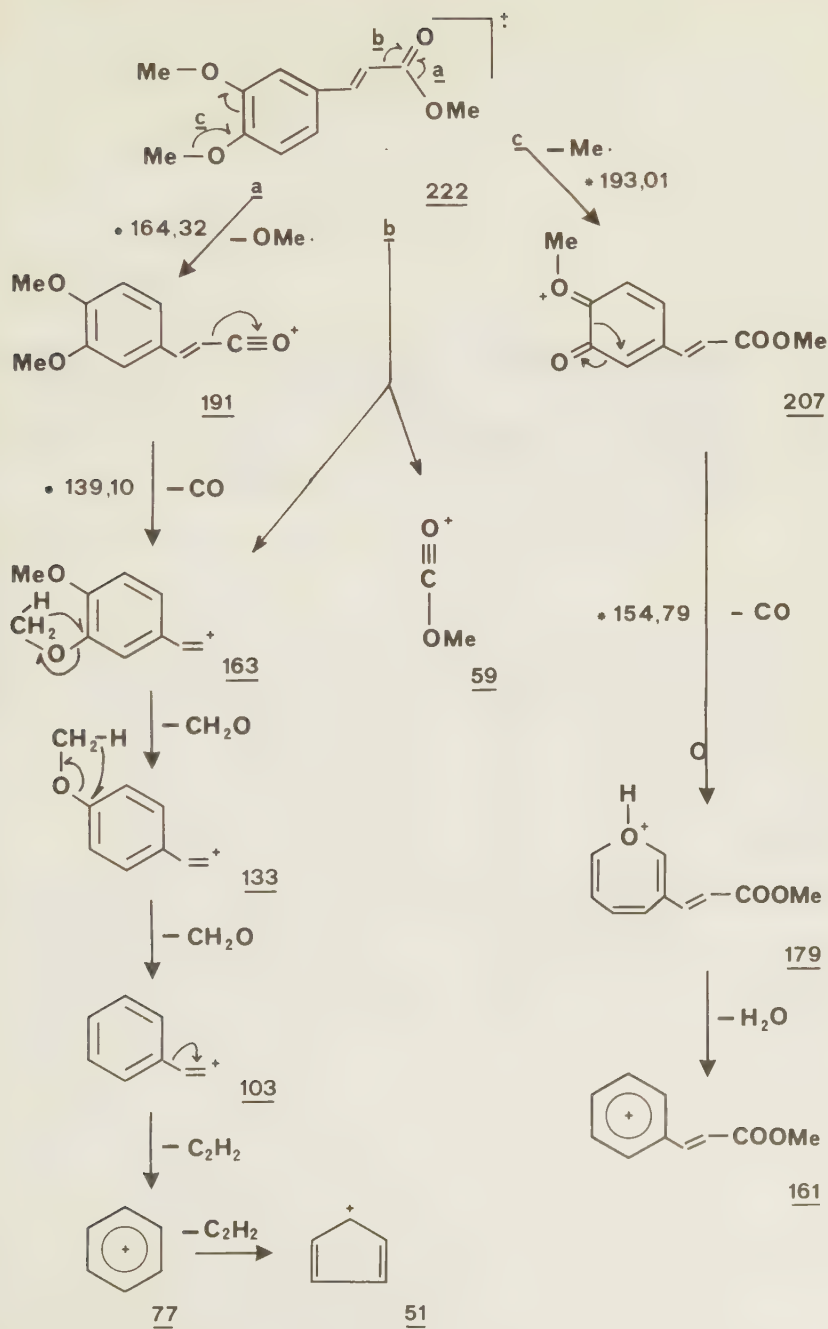


Fig. 38: Spectre de masse de ($G_3 + G_4$) méthylé

m/e	223	222	207	191	179	163	133	103	77	51
I %	19	100	26	56	6	12	7	7	12	11

Tableau 7: Intensité relative des pics principaux

Fragmentation: [58]



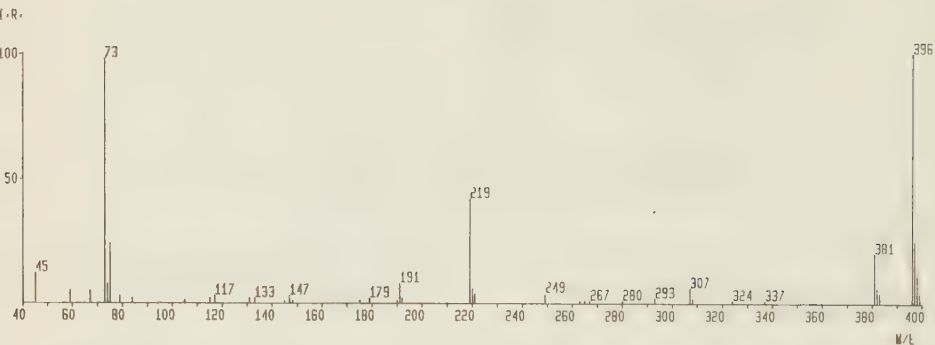
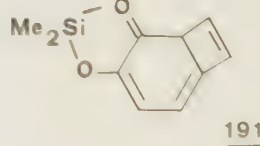
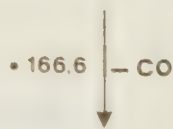
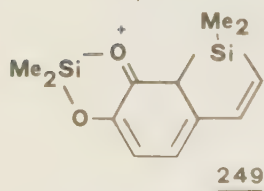
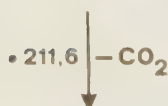
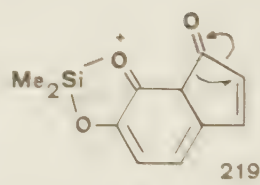
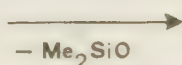
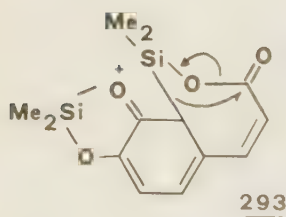
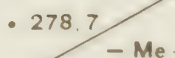
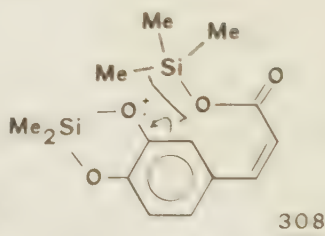
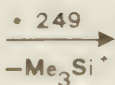
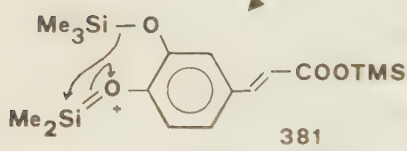
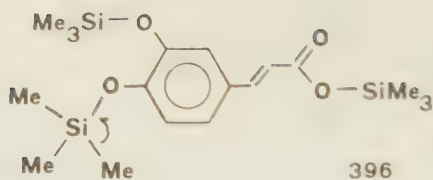


Fig. 39: Spectre de masse de (G₃+G₄) silylé

m/e	398	397	396	381	337	308
I %	12	25	100	20	2	2
m/e	307	293	267	249	219	191
I %	6	2	2	4	42	8

Tableau 5: Intensité relative des pics principaux



En parallèle, nous avons méthylé et silylé de l'acide caféique authentique. Les données analytiques (temps de rétention, spectres de masse) correspondent à ceux obtenus pour G_3 et G_4 méthylés et silylés.

Signalons toutefois que lors des essais de méthylation par le diazométhane, nous avons obtenu de l'acide caféique méthylé avec l'insertion d'un groupe méthylène en position α de la fonction ester en plus de l'acide totalement méthylé. Ce produit d'insertion s'est formé à la suite d'un excès en diazométhane de vingt fois la quantité stoechiométrique.

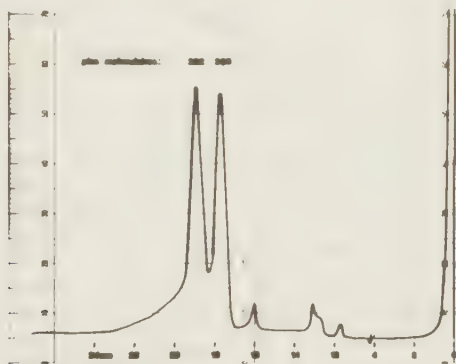


Fig. 40: Chromatogramme du mélange acide caféique méthylé
et du diméthoxy-3,4 homocinnamate de méthyle.

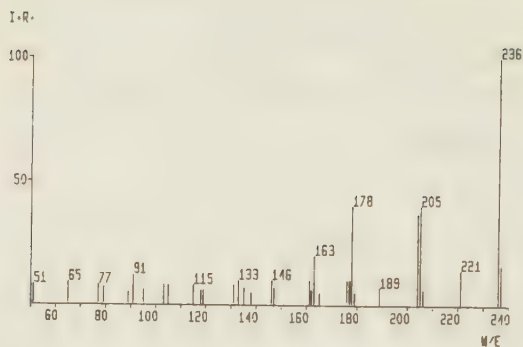
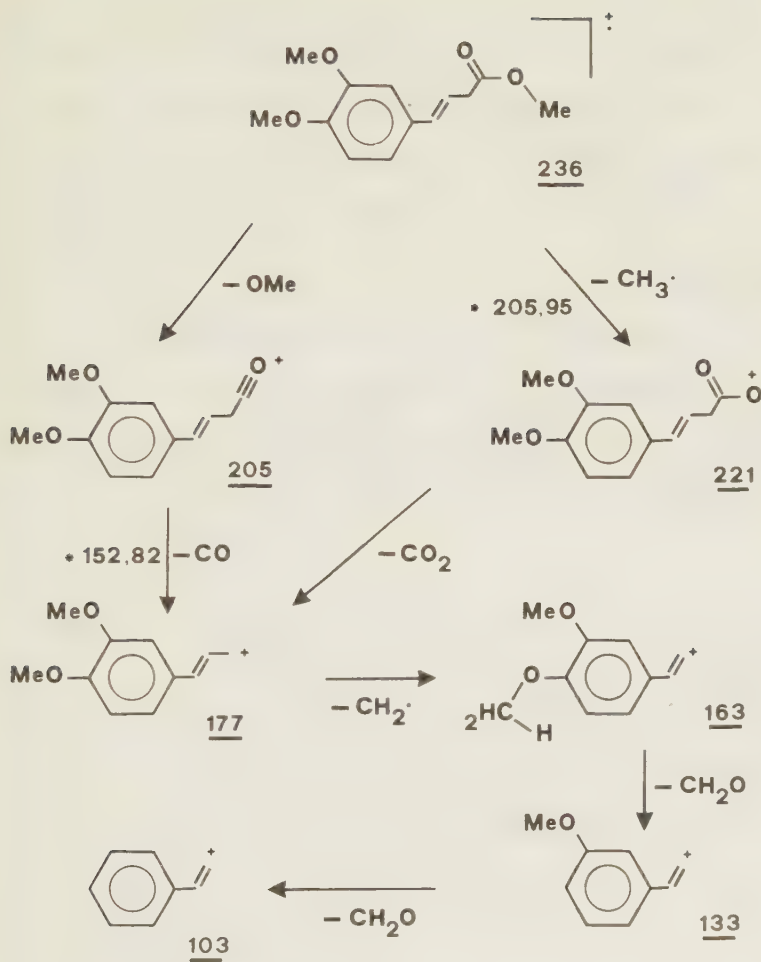
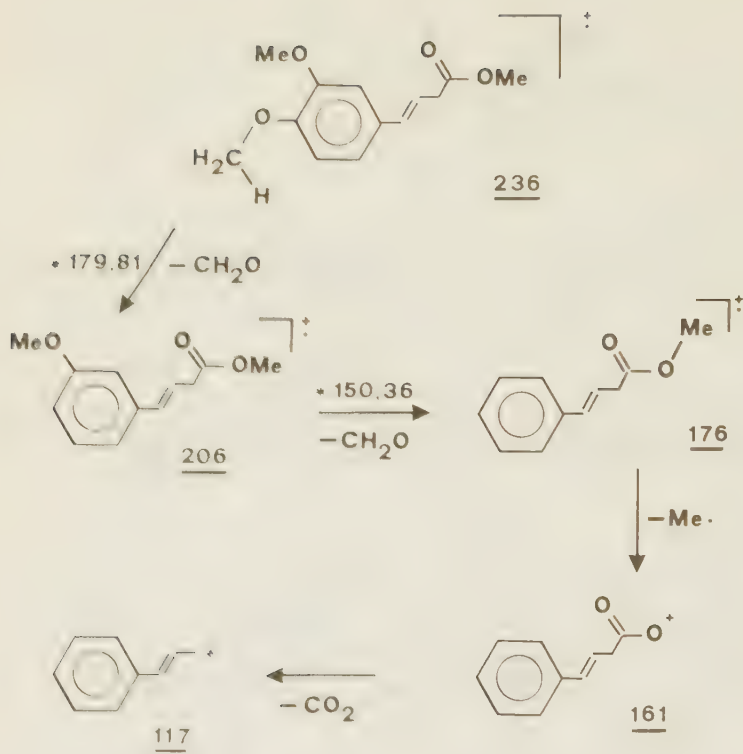


Fig. 41: Spectre de masse du diméthoxy-3,4 homocinnamate de méthyle

m/e	237	236	221	205	177	176
I %	16	100	14	40	10	10
m/e	163	161	117	103	77	51
I %	20	10	6	8	8	8

Tableau 9: Intensité relative des pics principaux

Fragmentation:



Le substituant de G est sans conteste l'acide caféique. Ce résultat nous permet de mieux interpréter les spectres UV de G dans le méthanol en présence de AlCl_3 . La bande à 380 nm est due à la formation d'un complexe avec le groupe O-dihydroxyle du reste caféoylé, alors que celle à 420 nm est due à la formation d'un complexe avec le groupe O-dihydroxyle de l'isoorientine.

Les deux groupes hydroxyles de l'acide caféique étant libres, celui-ci ne peut être attaché sur la partie C-glucoside flavonique que par une fonction ester, laquelle est confirmée par la bande de vibration à 1685 cm^{-1} présente dans le spectre IR de la substance G.

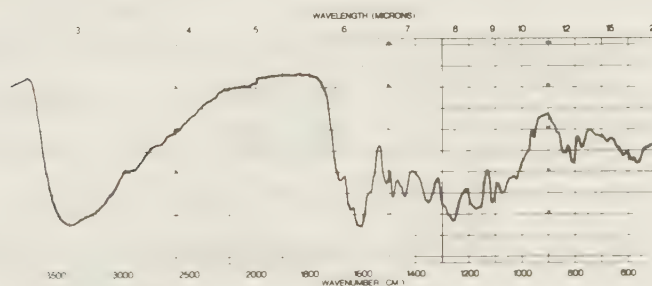


Fig. 42: Spectre IR de G

Il reste encore à élucider la position d'attache de l'acide sur l'isoorientine. A priori, celui-ci ne peut être lié par l'intermédiaire d'une fonction phénolique puisque les quatre groupes phénoliques, à savoir en position 5, 7, 3' et 4', du squelette flavonique de G sont libres. La possibilité qui nous semble la plus plausible est l'attache par l'intermédiaire d'un groupe alcool du reste C-glucosidique de G.

Ce mode d'attache est d'ailleurs confirmé par les analyses chromatographique et spectrale des produits de dégradation obtenus par l'action de HCl dilué sur le dérivé méthylé.

La méthylation de tous les groupes phénoliques par le diazométhane est contrôlée au moyen de la CCM (disparition du spot initial et apparition d'un spot fluorescent bleu à 350 nm à Rf supérieur). Une vérification supplémentaire est effectuée à l'aide des spectres UV du dérivé méthylé en présence des réactifs AlCl_3 et NaOMe. Parmi tous les groupes phénoliques d'une flavone, celui en position 5, formant un pont hydrogène avec le groupe carbonyle en 4, est le plus résistant à la substitution. Si aucun déplacement bathochrome de la bande I du spectre dans le méthanol n'est relevé lors de l'addition de AlCl_3 , le groupe phénolique en 5 est méthylé. De même, l'absence de tout déplacement par l'addition de NaOMe prouve la méthylation de tout autre groupe phénolique.

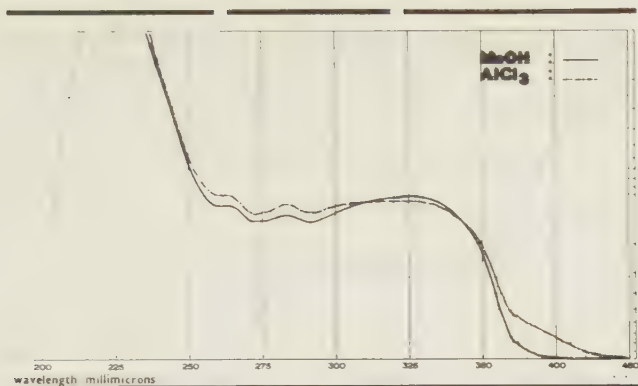


Fig. 43: Spectres UV du dérivé méthylé de G

Le mélange réactionnel de l'hydrolyse acide du dérivé méthylé de G est soumis au fractionnement selon le schéma établi précédemment (cf. Fig. 33).

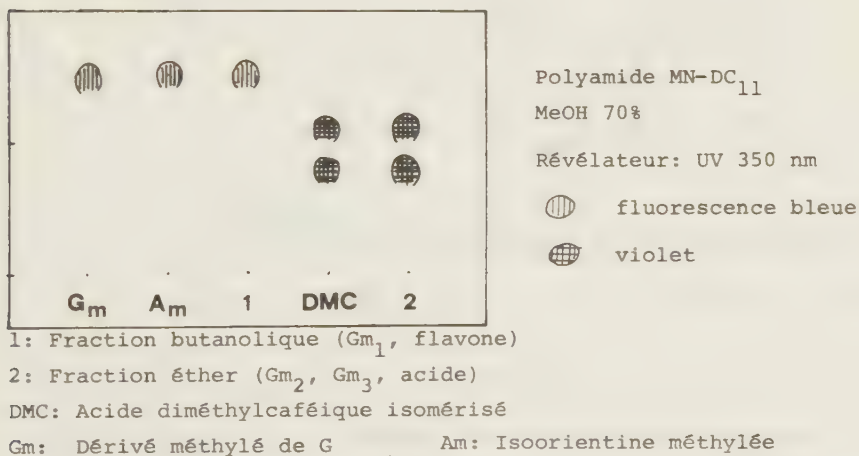


Fig. 44: Comportements chromatographiques des produits d'hydrolyse acide du dérivé méthylé de G.

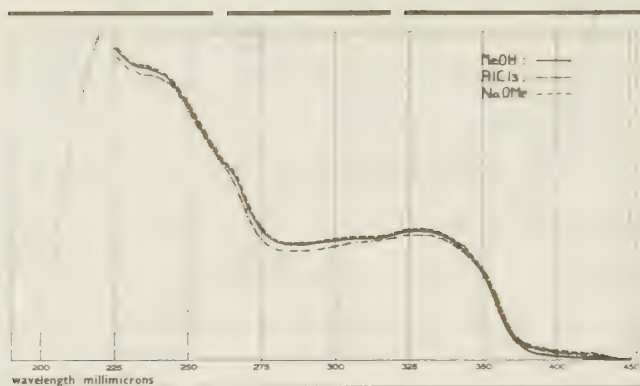


Fig. 45: Spectres UV de Gm₁

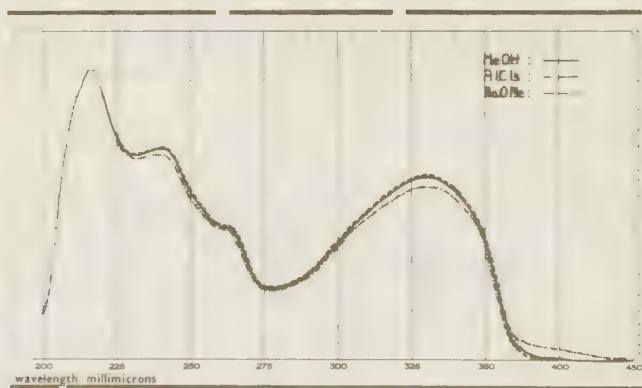


Fig. 46: Spectres UV du dérivé méthylé de l'isoorientine

Les bandes d'absorption du spectre de Gm₁ dans le méthanol ne sont pas affectées par AlCl₃ et NaOMe et sont identiques à celles de l'isoorientine méthylée. Les groupes phénoliques du squelette flavonique étant tous méthylés, l'acide caféique ne peut donc être fixé que sur la partie C-glucosidique.

La CCM montre un seul spot Gm_1 pour la fraction butanolique de l'hydrolysat. Ce fait est conforme à la réalité puisque l'hydroxyle en 5 est méthylé. En effet, de par le processus de Wessely-Moser, l'isomérisation des 6 ou 8 C-glycosides flavoniques ne peut avoir lieu que si l'hydroxyle en 5 est libre.

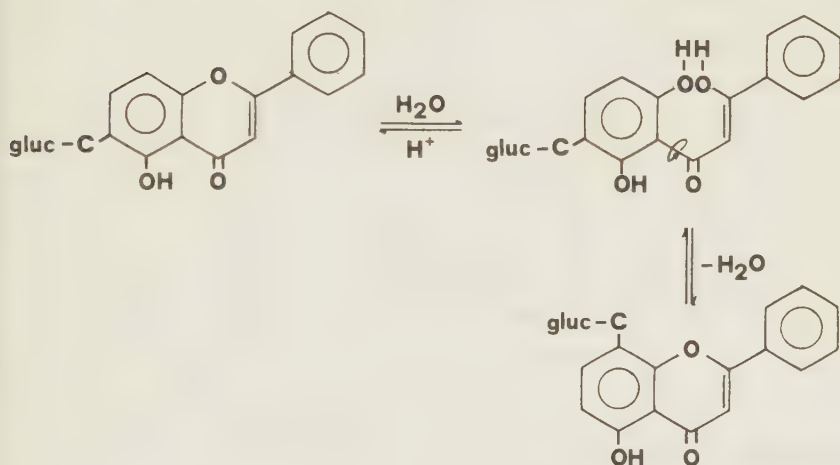


Fig. 47: Isomérisation selon Wessely-Moser

D'autre part, l'obtention des composés Gm_2 et Gm_3 qui correspondent chromatographiquement aux isomères cis-trans de l'acide diméthylcaféique prouve, une fois de plus, le mode d'attache de l'acide via la fonction ester.

Quant à la position d'attache de l'acide sur la partie C-glucosidique, elle est révélée par le spectre RMN du dérivé acétylé de G qui confirme la structure.

Tout comme la méthylation, l'acétylation complète est déterminée à l'aide de la CCM et du spectre UV du dérivé en présence du réactif AlCl_3 .

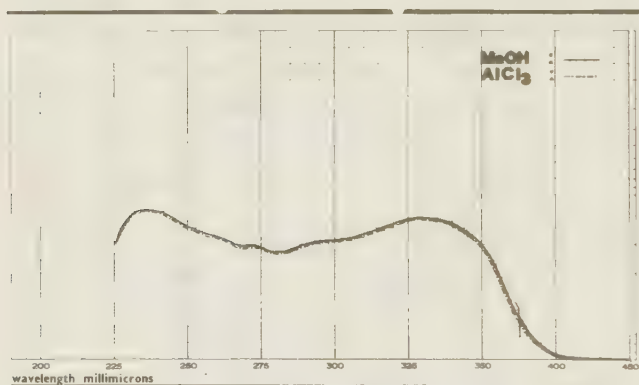


Fig. 48: Spectres UV du dérivé acétylé de G

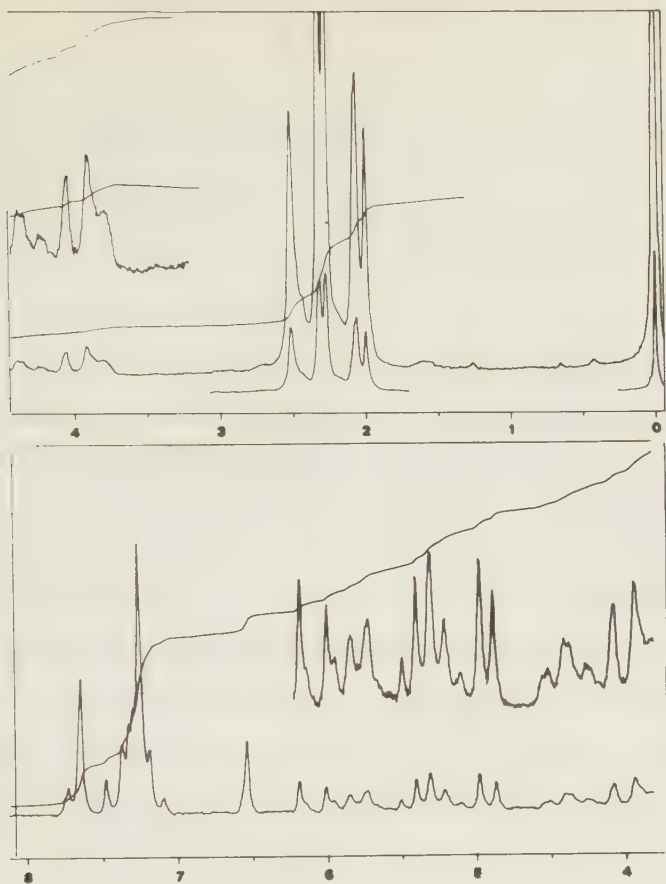


Fig. 49: Spectre ^1H RMN¹⁾ à 90 MHz du dérivé acétylé de
G dans CDCl_3

¹⁾ δ en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne

Nous relevons pour la partie C-glucoside flavonique:

- 4 groupes acétoxyles aromatiques dont deux à 2,31 (singulet, Ac-3' et Ac-4') et deux à 2,51 (singulet, Ac-5 et Ac-7)
- 5 protons aromatiques dont un à 6,51 (singulet, H-3), un à 7,40 (singulet, H-8), un à 7,41 (doublet, $J=9\text{Hz}$, couplage ortho, H-5'), un à 7,62 (doublet, $J=2\text{Hz}$, couplage méta, H-2') et un à 7,68 (doublet - doublet, $J=2$ et 9Hz , couplages méta et ortho, H-6')
- 3 groupes acétoxyles aliphatiques dont un à 2,00 (singulet, Ac-6") et deux à 2,06 (singulet, Ac-3" et Ac-4")
- 7 protons aliphatiques dont un à 4,92 (doublet, $J=10\text{Hz}$, couplage axial-axial, H-1"), un à 5,20 (doublet doublet, $J=9$ et 10Hz , couplage axial-axial, H-4"), un à 5,44 (doublet doublet, $J=9$ et 10Hz , couplage axial-axial, H-3"), un à 5,86 (doublet doublet, $J=9$ et 10Hz , H-2") et trois entre 3,80 - 4,55 (multiplet complexe, H-5" et 2 x H-6").

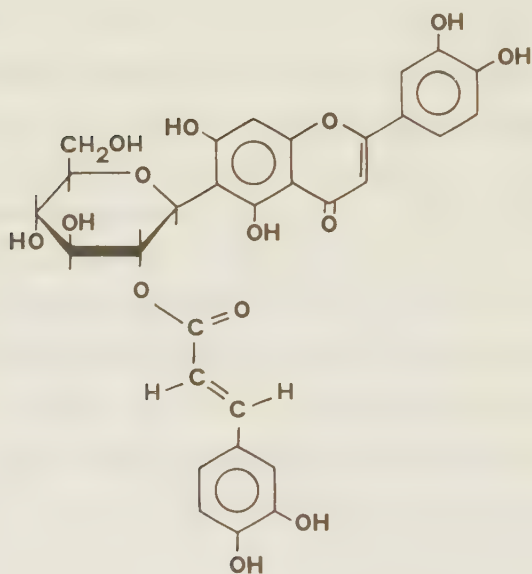
En outre, pour la partie caféoyle, nous comptons:

- 2 groupes acétoxyles aromatiques à 2,27 (singulet, Ac-3 et Ac-4)

- 2 protons éthyléniques dont un à 6,10 (doublet, $J=16\text{Hz}$, couplage trans, H- α) et un à 7,46 (doublet, $J=16\text{Hz}$, couplage trans, H- β) formant un spectre du type Ax
- 3 protons aromatiques entre 7,10 - 7,40 (H-2, H-5, H-6).

La constante de couplage axial-axial du proton anomérique H-1" du reste C-glucosidique confère à ce dernier la configuration β . De même, la constante de couplage $J=16\text{Hz}$ des deux protons éthyléniques permet d'attribuer la configuration trans au reste caféoylé. Le signal à 2,00 ppm relatif aux protons du groupe Ac-6" est caractéristique des dérivés acétylés des 6-C-glucosyl flavones [14]. D'autre part, l'absence de tout signal dans la région spectrale 1,8 - 1,83 ppm, région qui est propre au groupe AcO-2" des 6-C-glucosyl flavones acétylés [14] implique que la position 2" est occupée par un reste, en l'occurrence par le reste caféoylé.

Ainsi, les démarches entreprises nous conduisent à proposer pour la substance G la structure suivante: trans-caféoyl - 2" isoorientine.



5.1.2. SUBSTANCE H

Le spectre UV de H dans le méthanol en présence de AlCl_3 présente deux bandes d'absorption principale dans la région des grandes longueurs d'onde comme c'est le cas pour la substance G. Il existe donc, dans la structure de H, un deuxième chromophore autre que le chromophore cinnamoyle propre aux dérivés flavoniques; autrement dit, le squelette flavonique de H porte un substituant dont la nature est similaire à celui de G, à savoir l'acide caféique. Rappelons que dans le cas d'une flavone normale, l'examen du spectre UV dans le méthanol suffit pour déterminer l'état d'oxydation du cycle B. En revanche dans notre cas, les informations tirées uniquement du spectre UV dans le méthanol seraient erronées.

Par analogie aux spectres de G, la bande à 425 nm du spectre de H en présence de AlCl_3 résulte de la formation d'un complexe d'une part entre le métal et un groupe O-dihydroxyle et d'autre part entre le métal et les groupes hydroxyle en 5 et carbonyle en 4, tandis que la bande à 332 nm est propre au substituant de H. L'acide chlorhydrique résorbe la première bande alors que l'autre reste pratiquement inchangée. Nous concluons à la présence d'un groupe O-dihydroxyle sur le cycle B de la flavone et l'absence d'un tel groupe pour le substituant de H.

Le méthylate de sodium déplace la bande I du spectre dans le méthanol de 51 nm sans décroissance de l'intensité, ce qui est significatif d'un groupe hydroxyle en 4'. De même le déplacement bathochrome de la bande II par NaOAc révèle un groupe hydroxyle en 7.

Nous retiendrons pour la substance H la structure d'une tétrahydroxy-5,7,3',4' flavone à laquelle est attaché un substituant absorbant dans l'UV et ne portant pas de groupe O-di-hydroxyle.

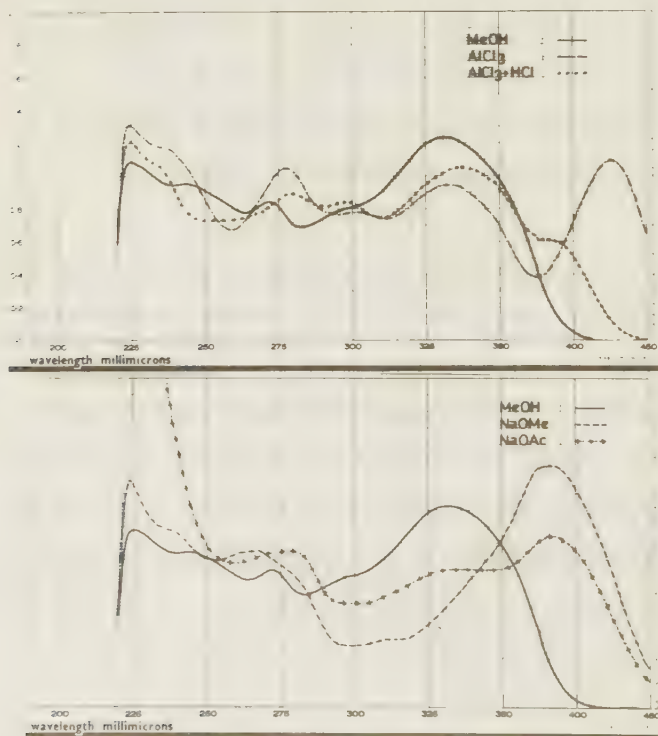


Fig. 50: Spectres UV de H

Tableau 10: Relevé des spectres UV de H

Réactifs	Maximums (nm)			
MeOH	272	297sh	331	
NaOMe	267	280sh	310sh	382
NaOAc	270sh	280sh	332sh	382
AlCl ₃	278	302sh	332	425
AlCl ₃ /HCl	279	298sh	337	384sh

En ce qui concerne le comportement chromatographique, la substance H ($R_f = 0,32$ PA MN-DC₁₁ - MeOH 90%) migre dans la zone intermédiaire entre celle des aglycones flavoniques et celle des monoglycosides flavoniques (cf. fig. 29). La similitude des comportements plaide, pour H, une structure analogue à celle de G, c'est-à-dire celle d'un cinnamoyle-X"-C-glucoside flavonique. Le R_f de H étant supérieur à celui de G, nous pouvons émettre l'hypothèse que le substituant de H ne porte qu'un seul groupe hydroxyle phénolique (un groupe de moins que la substance G).

L'enzyme β -glucosidase est inactif vis-à-vis de H réfutant ainsi la nature O-glucosidique terminale de celui-ci. En revanche, l'acide chlorhydrique dégrade H; nous détectons par CCM dans les phases butanolique et étherée de l'hydrolysât

respectivement les substances H_1 et H_2 correspondantes au reste flavonique et les substances H_3 et H_4 correspondantes au reste acide. Quant à la phase aqueuse, elle ne renferme aucun sucre (CCM et révélateurs). Ainsi, la substance H n'est pas un O-glucoside.



I: Polyamide MN-DC₁₁
MeOH 90%

II: Cellulose Merck
AcOH 10%

● : Fluorescence rose Révélateur: KOH2N/MeOH + UV 350 nm

- 1: H hydrolyse enzymatique, extrait butanolique
- 2: H
- 3: H hydrolyse acide, extrait butanolique (H_1 , H_2) purifié
- 4: Isoorientine (A) + orientine
- 5: H hydrolyse acide, extrait étheré (H_3 , H_4) purifié
- 6: Acide trans et cis férulique
- 7: Acide trans et cis isoférulique

Fig. 51: Chromatogramme de H hydrolysé

La pseudo-cinétique montre qu'il se forme, en premier lieu, H_1 et ensuite H_2 , lesquels s'identifient respectivement à l'isoorientine et à l'orientine par leurs comportements chromatographiques et leurs spectres UV. La substance H est donc un dérivé de l'isoorientine.

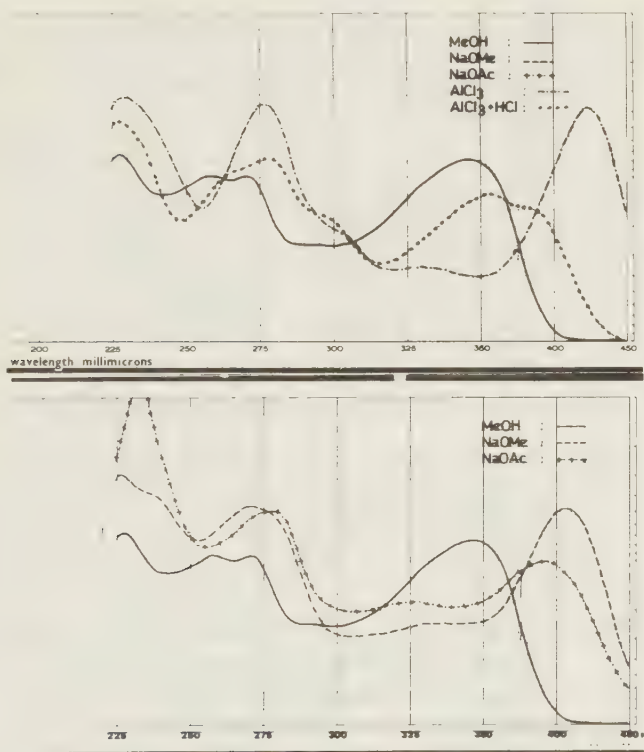


Fig. 52: Spectres UV de H_1 , H_2

Quant aux substances H_3 et H_4 , la CCM et les spectres UV montrent qu'il s'agit des isomères cis et trans de l'acide férulique (acide méthyl-3 caféïque).

Acides	Système chromatographique	Rf	Colorations				
			UV 350nm	Révélateur			
				A	A + Na ₂ CO ₃	B + Na ₂ CO ₃	B
H ₄ - H ₃	1	0,71-0,35	v	br	br-ve	p	g-ve
Ac.férulique cis-trans	1 ¹⁾	0,71-0,34	v	br	br-ve	p	g-ve
H ₄ - H ₃	2	0,57-0,54	bl-v	br	br	br	br
Ac.férulique cis-trans ²⁾	2	0,58-0,55	bl-v	br	br	br	br
H ₄ - H ₃	3	0,63	bl	br-j	br-j	o	br
Ac.férulique cis-trans ²⁾	3	0,63	bl	br-j	br-j	o	br
	4	0,49-0,38	bl	br-j	br-j	o	br

1: Cellulose Merck/AcOH 2%

2: Polyamide MN-DC₁₁/MeOH 90%

3: Silicagel 60 F 254 Merck/Benzène-MeOH-AcOH (45:8:3)

4: Silicagel 60 F 254 Merck/Toluène-AcOEt (3:10)

A: p-nitraniline diazotée

B: 4-nitro-O-anisidine diazotée (Echtrotsalz B, Fluka)

bl: bleu g: gris o: organe v: violet

br: brun j: jaune P: pourpre .ve: vert

Tableau 11: Caractéristiques chromatographiques du reste phénolique de H (H_3 , H_4)

1) Les acides cinnamiques s'isomérisent in situ dans le système chromatographique Cellulose-AcOH [21] [22]

2) Acide férulique isomérisé

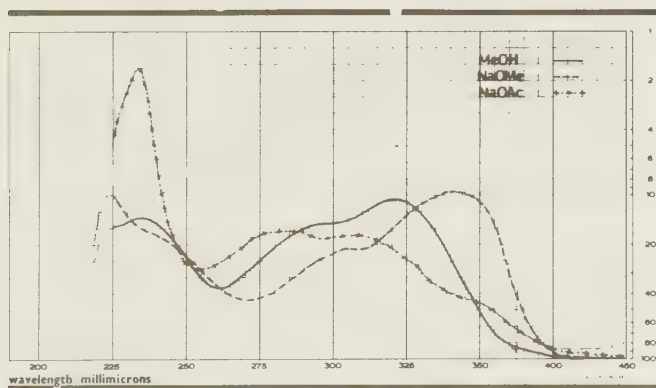
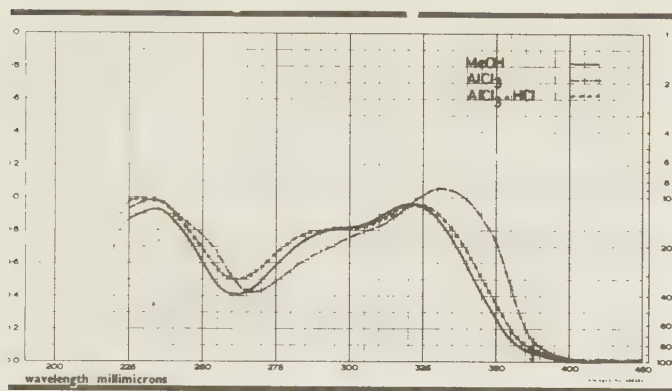


Fig. 53: Spectres UV de H_3 , H_4

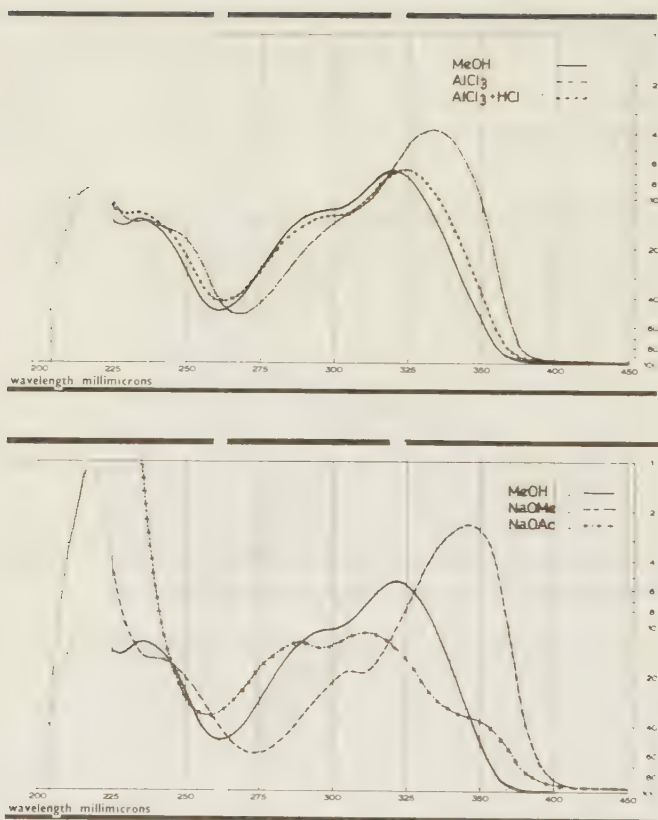


Fig. 54: Spectres UV de l'acide férulique isomérisé
(cis - trans)

Tableau 12: Relevé des spectres UV de H_3 et H_4 et de l'acide férulique isomérisé

Réactifs	Maximums (nm)		
$H_3 + H_4$			
MeOH	297	321	
NaOMe	305	343	
NaOAc	285	308	350sh
$AlCl_3$	300sh	331	
$AlCl_3/HCl$	297	323	
<u>Acide férulique isomérisé</u>			
MeOH	297	321	
NaOMe	305	346	
NaOAc	288	312	350sh
$AlCl_3$	300sh	333	
$AlCl_3/HCl$	297	324	

Une confirmation supplémentaire est fournie par les données analytiques du dérivé silylé de H_3H_4 , lesquelles sont obtenues par couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (CG-SM) et correspondent à ceux de l'acide férulique silylé authentique.

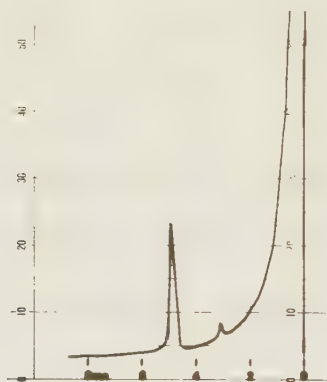


Fig. 55: Chromatogramme de (H_3+H_4) silylé

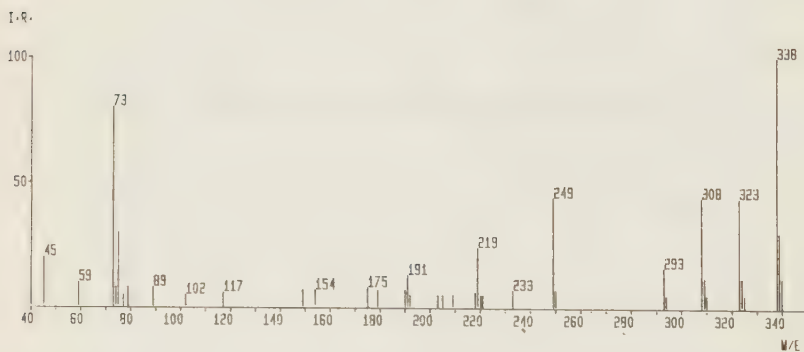
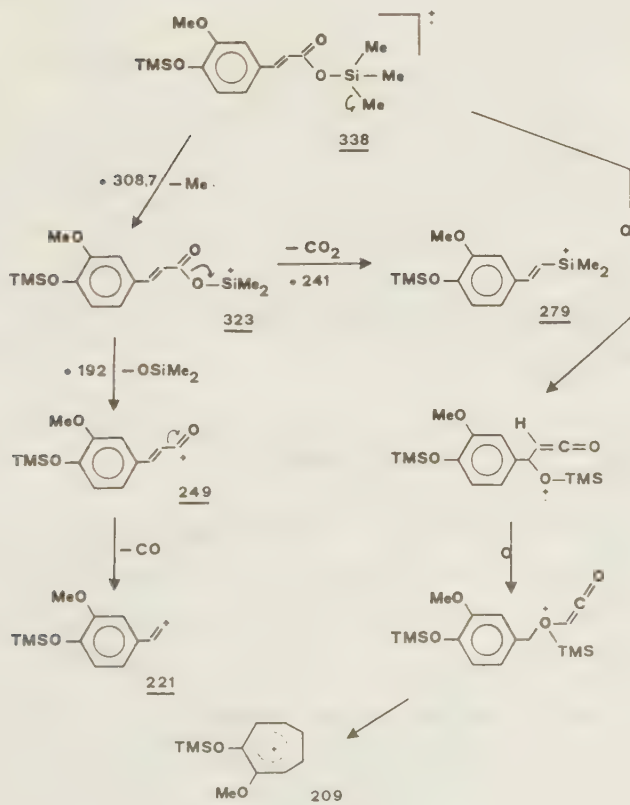


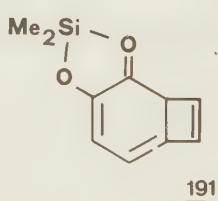
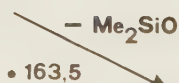
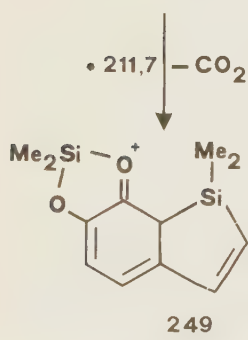
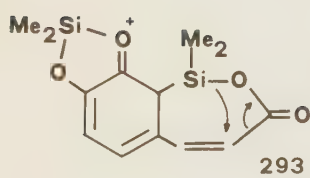
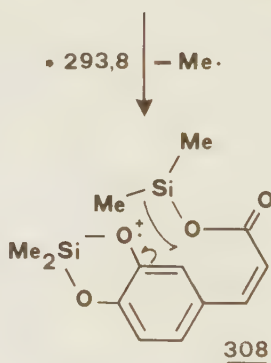
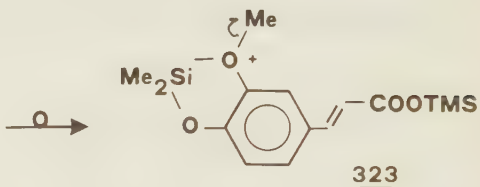
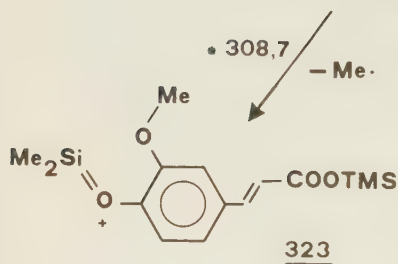
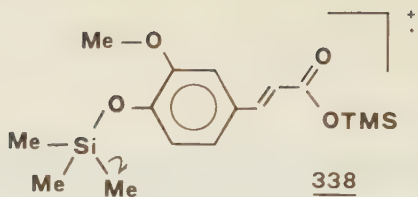
Fig. 56: Spectre de masse de (H_3+H_4) silylé

m/e	340	339	338	323	308	293	279	249	221	219	209
I %	12	30	100	44	44	16	4	44	5	24	5

Tableau 13: Intensité relative des pics principaux

Fragmentation: [58]





La nature du substituant de H étant établie, il reste à déterminer le mode d'attache. Au premier abord, il est légitime de penser que l'acide férulique est rattaché au squelette flavonique par le truchement d'une fonction ester puisque le spectre IR de la substance H présente une bande de vibration à 1670 cm^{-1} .

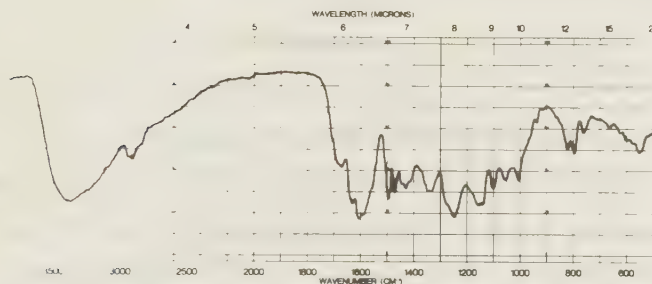


Fig. 57: Spectre IR de H

L'acide peut être estérifié soit par une fonction alcool du reste C-glucidique soit par une fonction phénol du reste flavonique. La dernière possibilité est à exclure car, selon les spectres UV de H, les quatre groupes hydroxyles de l'iso-orientine sont libres. Pour vérifier ces hypothèses, nous avons effectué l'hydrolyse acide du dérivé méthylé de H.

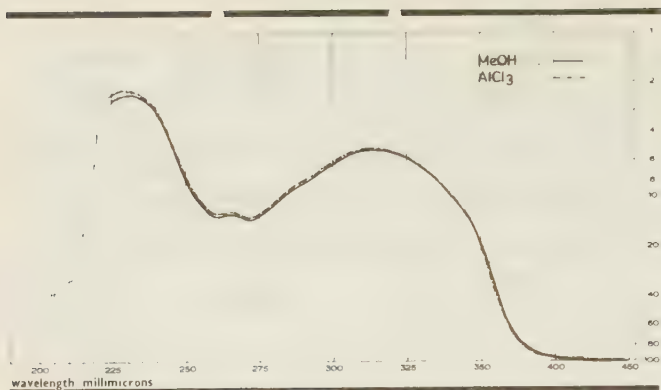


Fig. 58: Spectres UV du dérivé méthylé de H

Nous obtenons dans la fraction butanolique de l'hydrolysat une substance Hm_1 dont le comportement chromatographique et les spectres UV correspondent à ceux de l'isoorientine méthylée, et dans la fraction étherée deux substances Hm_2 et Hm_3 chromatographiquement identiques aux isomères cis et trans de l'acide diméthylcaféique. Autrement dit, nous obtenons les mêmes produits d'hydrolyse que pour la substance G méthylée.

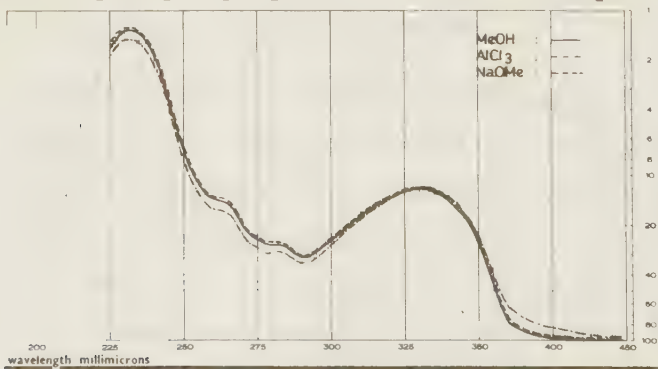


Fig. 59: Spectres UV de Hm_1

Les résultats obtenus montrent indubitablement que l'acide férulique est fixé sur la partie C-glucidique de H et cela par l'intermédiaire d'une fonction ester. Quant au site d'attache, l'attribution des signaux acétyles aliphatiques du spectre RMN du dérivé acétylé de H nous permettra de la déterminer.

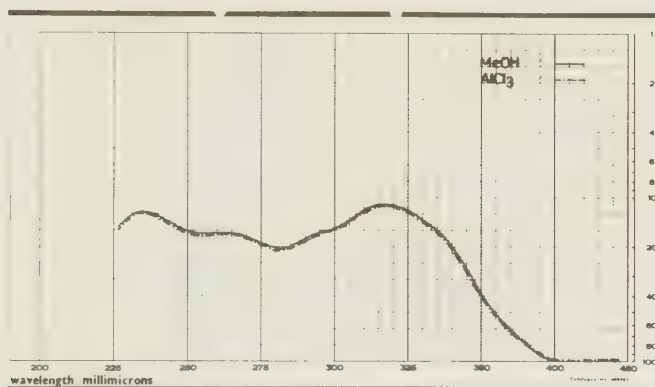


Fig. 60: Spectres UV du dérivé acétylé de H

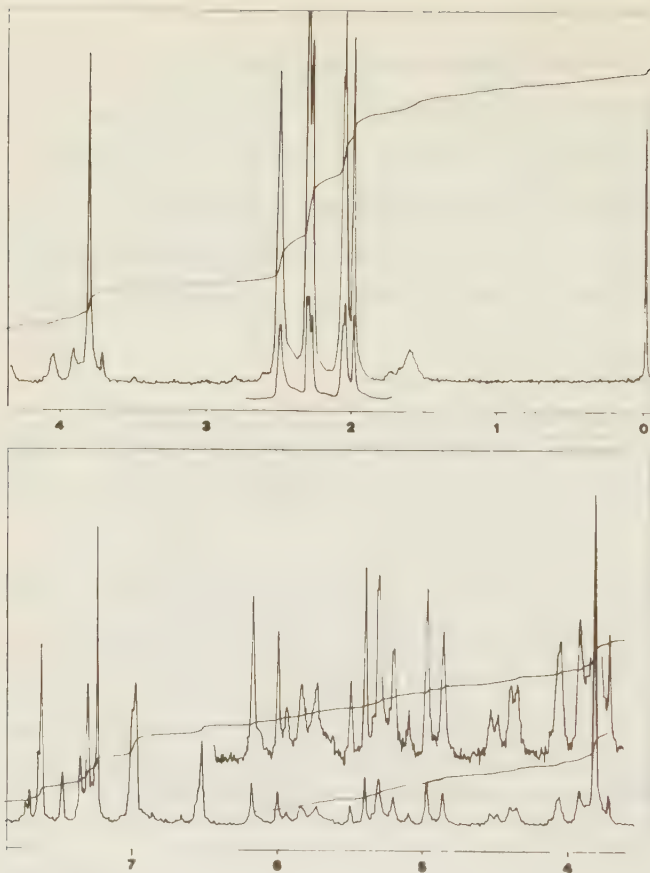


Fig. 61: Spectres ^1H -RMN¹⁾ à 90 MHz du dérivé acétylé de H dans CDCl_3

1) δ en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne

Dans le spectre RMN du dérivé acétylé de H nous relevons:

- pour la partie C-glucoside flavonique:

- 4 groupes acétoxyles aromatiques dont un à 2,31 ppm (singulet, Ac-3'), un à 2,32 ppm (singulet, Ac-4') et 2 à 2,51 ppm (singulet, Ac-5 et Ac-7),
- 5 protons aromatiques dont un à 6,54 ppm (singulet, H-3), un à 7,32 ppm (singulet, H-8), un à 7,37 ppm (doublet, $J=9\text{Hz}$, H-5'), un à 7,64 ppm (doublet, $J=2\text{Hz}$, H-2') et un à 7,69 ppm (double doublet, $J=2$ et 9Hz , H-6'),
- 3 groupes acétoxyles aliphatiques dont un à 2,00 ppm (singulet, Ac-6"), un à 2,06 ppm (singulet, Ac-3") et un à 2,07 ppm (singulet, Ac-4"),
- 7 protons aliphatiques dont un à 5,84 ppm (double doublet, $J=9$ et 10Hz , H-2"), un à 5,41 ppm (double doublet, $J=9$ et 10Hz , H-3"), un à 5,21 ppm (double doublet, $J=9$ et 10Hz , H-4"), trois entre 3,70 - 4,55 ppm (multiplet, H-5" et 2 x H-6") et un à 4,92 ppm (doublet, $J=10\text{Hz}$, H-1").

- pour la partie féruloyle

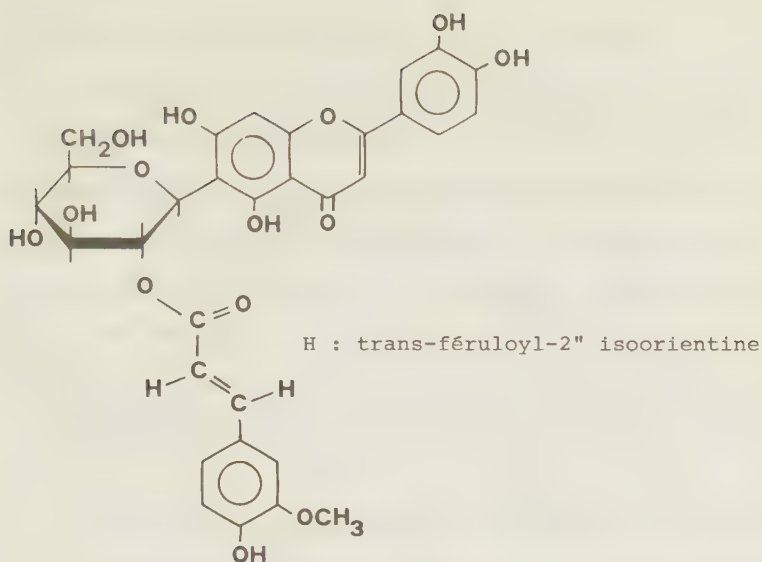
- 1 groupe acétoxy aromatique à 2,29 ppm (singulet, Ac-4),

- 1 groupe méthoxyle aromatique à 3,82 ppm (singulet, MeO-3),
- 3 protons aromatiques entre 6,90 - 7,70 ppm (H-2, H-5, H-6),
- 2 protons éthyléniques dont un à 6,10 ppm (doublet, $J=16\text{Hz}$, H- α) et un à 7,42 ppm (doublet, $J=16\text{Hz}$, H- β) formant un spectre du type Ax.

L'absence de tout signal dans la région spectrale δ 1,70 - 1,83 ppm où résonnent les protons des groupes acétoxyles en 2" des C-glucosides flavoniques [14], est une preuve de la substitution du dit groupe dans la substance H. Par conséquent, l'acide férulique est fixé en position 2" sur l'isoorientine dont la nature 6-C-glucosyle est confirmée par le déplacement chimique du groupe Ac-6" (δ 2,00 ppm).

Les constantes de couplage $J=10\text{Hz}$ et $J=16\text{Hz}$ respectivement du proton anomérique H-1" et des protons éthyléniques H- α et H- β confèrent la configuration β pour le reste glucosidique et la configuration trans pour le reste féruloyle.

Les preuves étant acquises, la structure proposée pour la substance H est la trans-féruloyl-2"-isoorientine



5.1.3. SUBSTANCE E*

Le spectre UV de E* dans le méthanol présente deux principales bandes d'absorption à 325 nm et 272 nm, lesquelles se situent dans les régions d'absorbance caractéristique des composés flavoniques. L'allure du spectre en présence de AlCl_3 , notamment l'épaule précédant le maximum dans la région 325-400 nm, est tout à fait normal pour un dérivé flavonique contrairement aux substances G et H.

La bande I à 325 nm du spectre de E* dans le méthanol est révélatrice d'un cycle B O-substitué en 4' (cf. tableau 2), substitution d'ailleurs confirmée par la baisse d'intensité

de la bande en présence de NaOMe. Les spectres effectués en présence de AlCl_3 et $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ sont identiques; la substance H ne porte pas de groupe O-dihydroxyle. Par contre, la présence d'un groupe hydroxyle en position 5 est à relever car la bande I du spectre dans le méthanol subit un déplacement bathochrome sous l'effet de $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$. Un déplacement semblable de 5 nm dû au NaOAc est aussi observé pour la bande II: H est hydroxylé en position 7.

Ainsi, les spectres UV prévoient pour la substance E* la structure de base d'une dihydroxy-5,7 flavone O-substituée en position 4'.

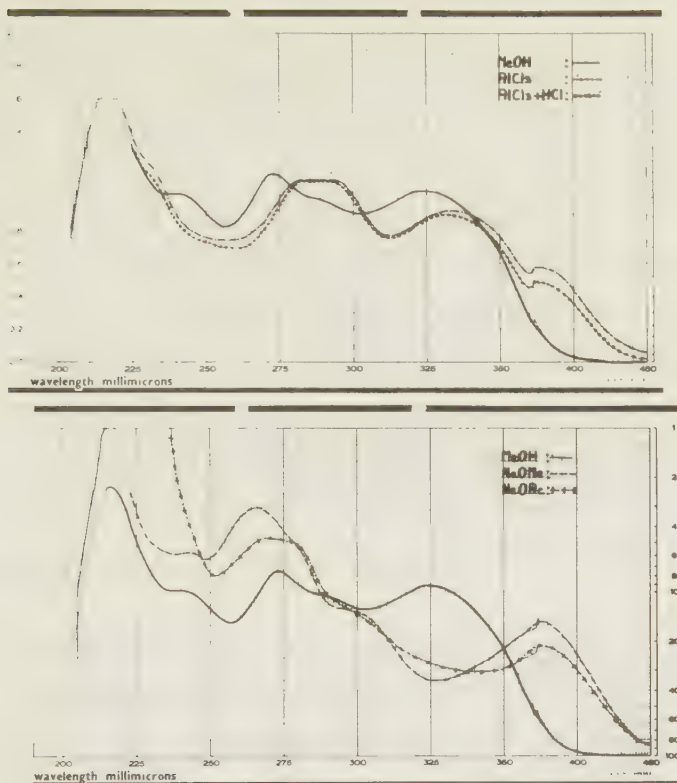


Fig. 62: Spectres UV de E*

Réactifs	Maximums (nm)			
MeOH	242	275	290sh	325
NaOMe	245	268	300sh	375
NaOAc	242sh	280	325sh	375
AlCl ₃	282	294	334	380sh
AlCl ₃ /HCl	282	294	332	380sh

Tableau 14: Relevé des spectres UV de E*

La substance E* accuse un Rf (0,8) identique à celui de l'isoorientine 4'-glucoside (substance E) dans le système chromatographique polyamide MN DC₁₁-MeOH 90%. Pourtant il ne peut s'agir de la même substance car, d'une part, E* et E présentent des spectres UV différents et, d'autre part, E* possède un Rf (0,65) nettement supérieur à celui de E (0,45) dans le système cellulose Merck AcOH 15%. Le Rf élevé de E* dans le dernier système suggère la structure d'un triglycoside plutôt que d'un diglycoside. Cependant, une telle structure est en contradiction formelle avec le comportement de E* sur couche de polyamide; le Rf devrait être plus élevé.

La nature triglycosidique et la valeur Rf de E* ne peuvent être compatibles que si nous envisageons pour cette substance la structure d'un triglycoside flavonique possédant outre les substances déterminées par les spectres UV, à savoir deux groupes hydroxyles en 5 et 7 et un groupe OR en 4', un ou deux groupes phénoliques supplémentaires. Cette hypothèse nous conduit à supposer que E* est de structure similaire à G et H.

Nous en avons apporté la preuve par l'hydrolyse de E* par l'enzyme β -glucosidase laquelle fournit une substance E* enz. dont le comportement chromatographique et les spectres UV sont rigoureusement identiques à ceux de la substance G, identifiée auparavant. Ainsi E* est un O- β -D-glucoside de la trans-caféoyl-2" isoorientine.

Relevons que le spectre IR de E* présente une bande de vibration à 1700 cm^{-1} attribuable à une fonction ester.

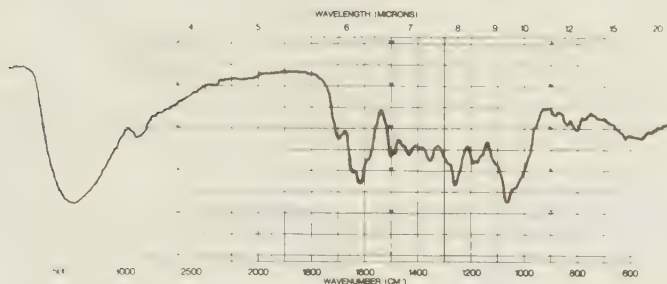
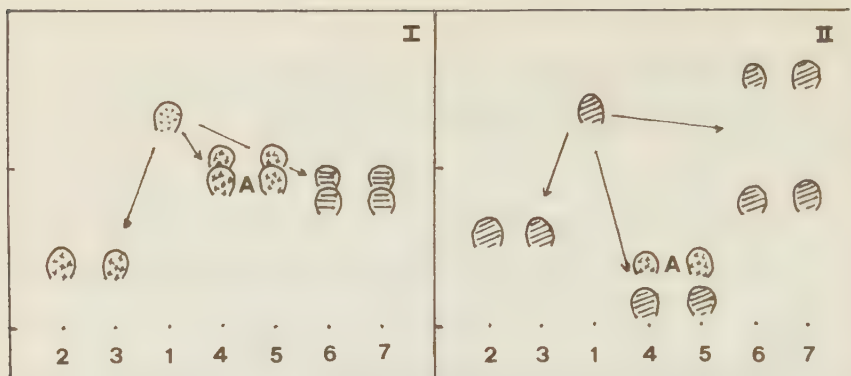


Fig. 63: Spectre IR de la substance E*

Afin de procéder à un contrôle supplémentaire de l'identité de E* enz., nous avons soumis cette substance à l'action de HCl dilué. L'hydrolyse libre, dans la phase butanolique, une substance E*₁ s'isomérisant en substance E*₂ correspondant respectivement à l'isoorientine et à son isomère orientine (comportement chromatographique et spectres UV) et, dans la phase étherée, deux substances E*₃ et E*₄ correspondant aux isomères cis-trans de l'acide caféique (co-chromatographie et révélation). En revanche, aucun sucre n'est décelé dans la phase aqueuse.

L'hydrolyse acide de E* mène d'autre part aux substances E*₁, E*₂, E*₃, E*₄ et au glucose (co-chromatographie et révélation).



I: Polyamide MN-DC₁₁

MeOH 90%

II: Cellulose Merck

ACOH 10%

Révélateur: KOH2N/MeOH + UV 350 nm

1: E* 3: E* hydrolyse enzymatique = E* enz.

2: G 4: E* enz. hydrolyse acide, extrait butanolique (E*₁ E*₂)

5: Isoorientine (A) + orientine

6: E*₃ + E*₄

7: Acide caféique cis-trans

Fig. 64: Chromatogramme de E* hydrolysé

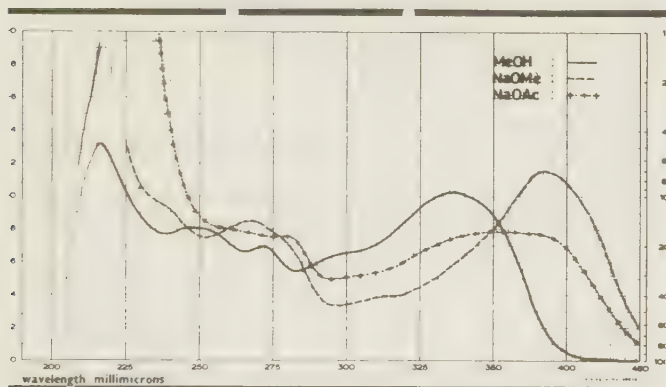
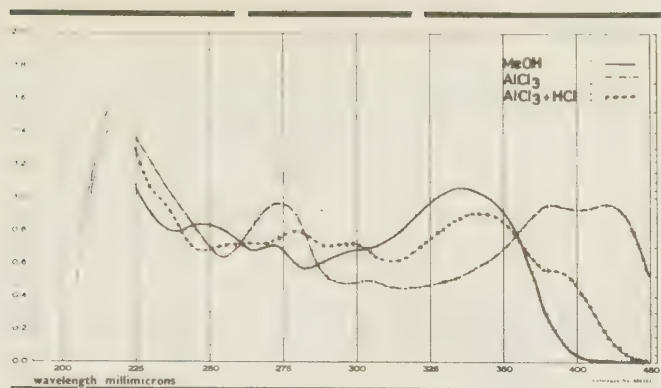


Fig. 65: Spectres UV de E* enz.

Précédemment, nous avons établi que E* est un O-glucoside de la trans-caféoyl-2"isoorientine. Le comportement chromatographique et l'hydrolyse enzymatique attribuent à E* 2 unités O-glucosidiques supplémentaires.

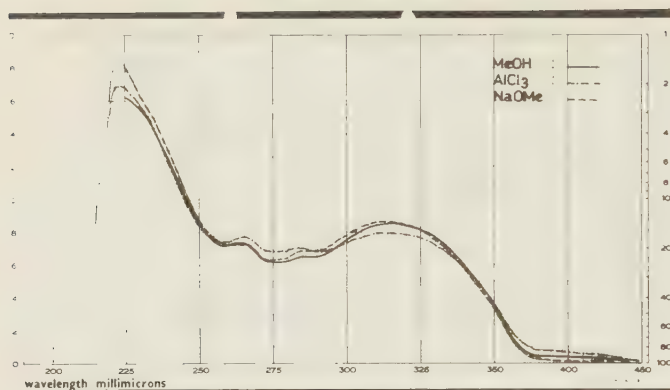


Fig. 66: Spectres UV du dérivé méthylé de E*

L'hydrolyse du dérivé méthylé libère, dans la phase butanolique, une substance E^*m_1 et, dans la phase étherée, deux substances E^*m_2 et E^*m_3 . La substance E^*m_1 , sur la base du comportement chromatographique et des spectres UV, est identique à la triméthyl-5,7,3' isoorientine obtenue par méthylation suivie de l'hydrolyse acide de l'isoorientine-4'-O-glucoside. En effet, les spectres UV de E^*m_1 ne sont pas modifiés par les réactifs $AlCl_3$ et $NaOAc$: les hydroxyles en 5 et 7 sont méthylés et il y a absence de groupe O-dihydroxyle. Par contre, $NaOMe$ déplace la bande I de 64 nm sans décroissance de l'intensité, signifiant ainsi la présence d'un groupe hydroxyle en 4' et par conséquent la méthylation de l'hydroxyle en 3'. Quant aux substances E^*m_2 et E^*m_3 , elles s'identifient aux isomères cis-trans de l'acide férulique (co-chromatographie et révélation).

Il apparaît donc deux sites auxquels sont rattachés les deux unités de glucose: l'un en position 4' sur le noyau flavonique et l'autre en position para sur le cycle benzénique de l'acide caféique.

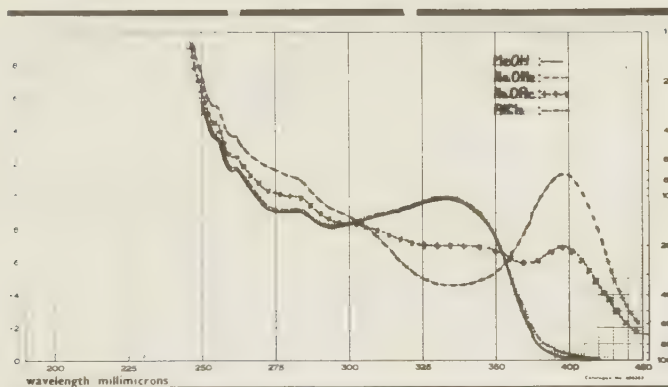


Fig. 67: Spectres UV de E^*m_1

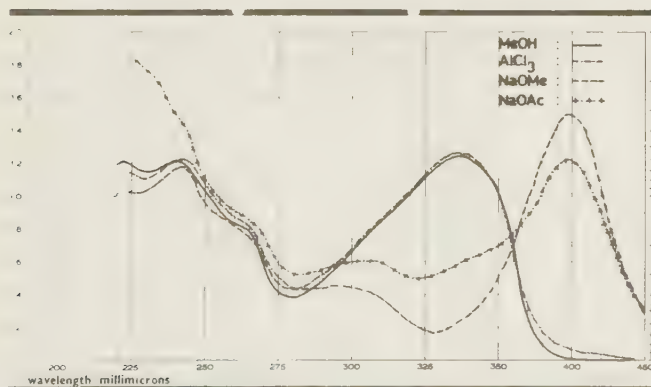


Fig. 68: Spectres UV de la triméthyl-5,7,3' isoorientine

Les résultats des investigations convergent vers l'hypothèse de structure suivante pour la substance E*: p- β -D-glucosyl-trans-caféoyl-2'' isoorientine-4'-O- β -D-glucoside, structure vérifiée par le spectre RMN du dérivé acétylé.

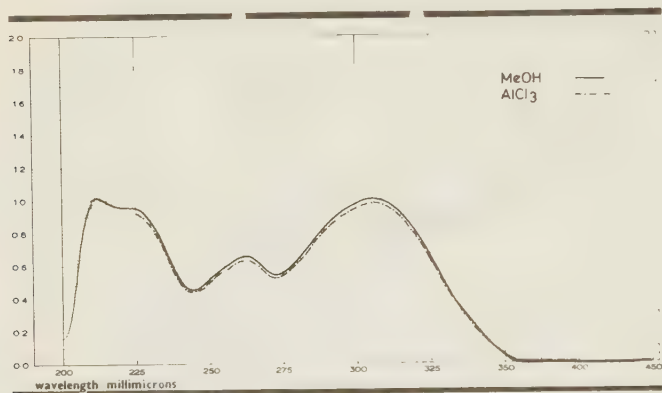
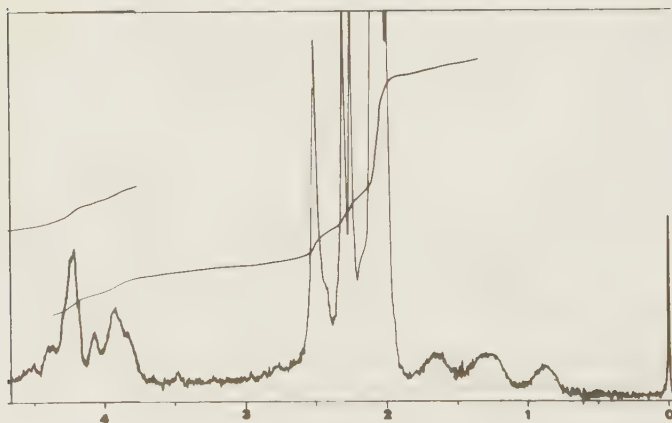


Fig. 69: Spectres UV du dérivé acétylé de E*



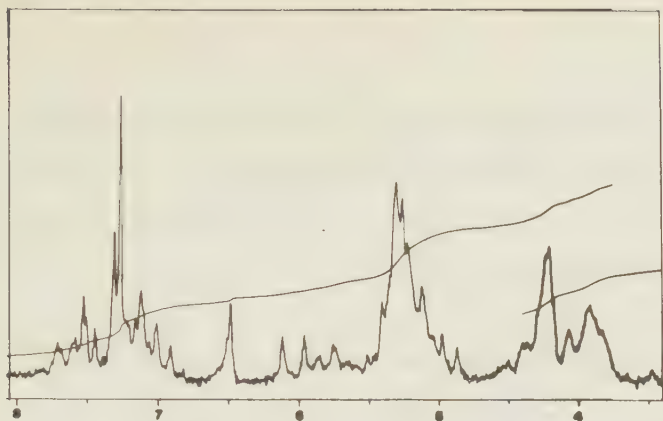


Fig. 70: Spectre $^1\text{H-RMN}^{1)}$ à 90 MHz du dérivé acétylé de E^* dans CDCl_3

$^{1)}$ δ en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne.

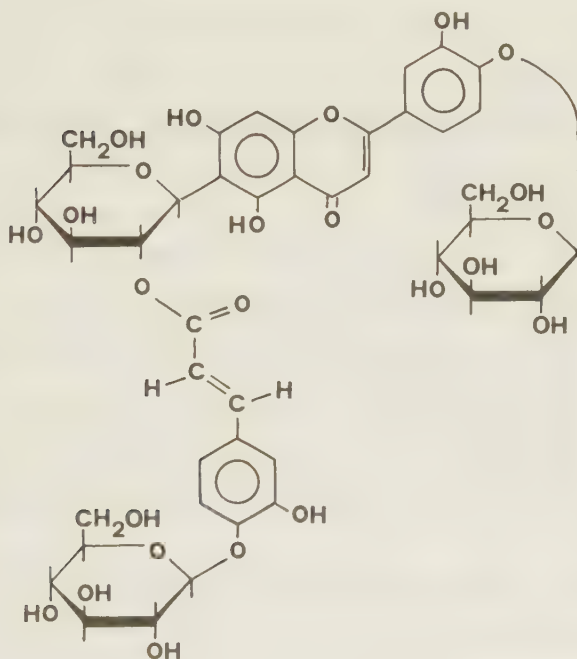
Le spectre RMN du dérivé acétylé de E^* montre:

- pour la partie C-glucoside flavonique:
 - 3 groupes acétoxyles aromatiques dont un à 2,28 ppm (singulet, Ac-3') et deux à 2,50 ppm (singulet, Ac-5 et Ac-7),
 - 5 protons aromatiques dont un à 6,51 ppm (singulet, H-3), un à 7,31 ppm (singulet, H-8) et 3 entre 6,90 - 7,70 ppm (H-2', H-5' et H-6'),
 - 11 groupes acétoxyles aliphatiques dont trois à 2,08 ppm, 7 à 2,06 ppm et un à 1,99 ppm correspondant aux trois groupes acétoxyles du reste C-glucosidique et 8 groupes acétoxyles des deux restes O-glucosidiques,

- 21 protons aliphatiques dont vingt entre 3,80 et 5,87 ppm et un à 4,92 ppm (doublet, $J=10\text{Hz}$, H-1");
- pour la partie caféoyale:
 - 1 groupe acétoxyle aromatique à 2,23 ppm (singulet Ac-3),
 - 3 protons aromatiques entre 6,90 - 7,70 ppm (H-2, H-5 et H-6),
 - 2 protons éthyléniques dont un à 6,06 ppm (doublet, $J=16\text{Hz}$, H- α) et un à 7,58 ppm (doublet, $J=16\text{Hz}$, H- β), formant un spectre du type Ax.

Nous notons donc l'absence de signal correspondant au groupe acétyle en 2" ($\delta = 1,8 - 1,83$ ppm) prouvant, de ce fait, la position d'attache de l'acide caféique substitué. Les configurations β et trans sont respectivement attribuées au restes C-glucosidique et caféoyale sur la base des constantes de couplage $J=10\text{Hz}$ (axial-axial) du proton anomérique H-1" et $J=16\text{Hz}$ des protons éthyléniques H- α et H- β . Les intégrales des signaux acétyles aromatiques à 2,28 ppm et à 2,23 ppm correspondent pour chacun à un seul groupe acétyle. Il manque donc deux groupes, en l'occurrence l'un sur le noyau benzénique de l'acide caféique et l'autre sur le cycle B de la flavone. Ceci vérifie, une fois de plus, les positions d'attache des deux restes O-glucosidiques de E*.

Ainsi, le spectre RMN confirme la structure proposée précédemment pour la substance E*: p-O- β -D-glucosyl-trans-caféoyl-2'' isoorientine-4'-O- β -D-glucoside.



5.1.4. SUBSTANCE C_1

Le spectre UV de C_1 dans le méthanol est caractéristique d'un dérivé flavonique; la bande I absorbe à 319 nm et la bande II à 273 nm. Le maximum de la première bande est significatif d'un cycle B non oxygéné. Pourtant, la diminution d'intensité de la bande I du spectre effectué en présence de NaOMe est révélatrice d'un groupe hydroxyle substitué (-OR) en position 4'. Cette anomalie nous incite à penser qu'il s'agit d'une substance de structure similaire aux substances précédemment identifiées. Cela est d'autant plus plausible que le spectre IR de C_1 présente une bande ester à 1715 cm^{-1} . L'étude des déplacements dans le spectre UV provoqués par l'addition de réactifs, AlCl_3 , $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ et NaOAc , montre que le squelette flavonique est hydroxylé en position 5 et 7 et ne porte pas de groupe O-dihydroxyle.

La substance C_1 serait donc un dérivé flavonique hydroxylé en 5 et 7 et O-substitué en 4'.

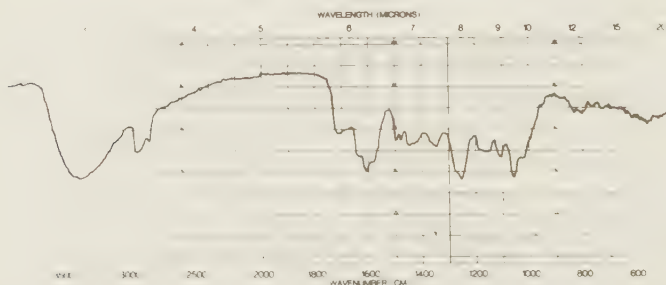


Fig. 71: Spectre IR de la substance C_1

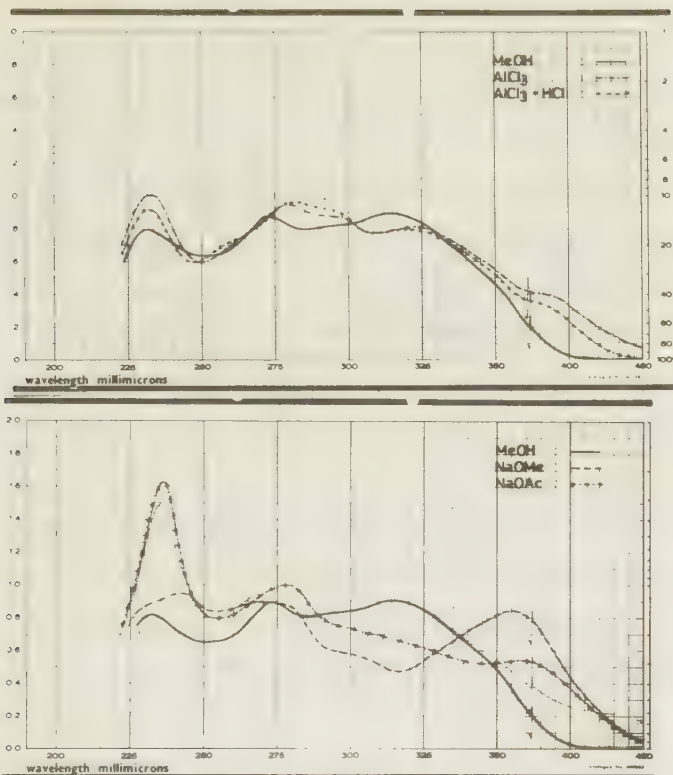


Fig. 72: Spectres UV de C_1

Réactifs	Maximums (nm)			
MeOH	273	293sh	314	
NaOMe	280	305sh	360	
NaOAc	279		364	
$AlCl_3$	279	297sh	323	384sh
$AlCl_3/HCl$	281	297sh	320	384sh

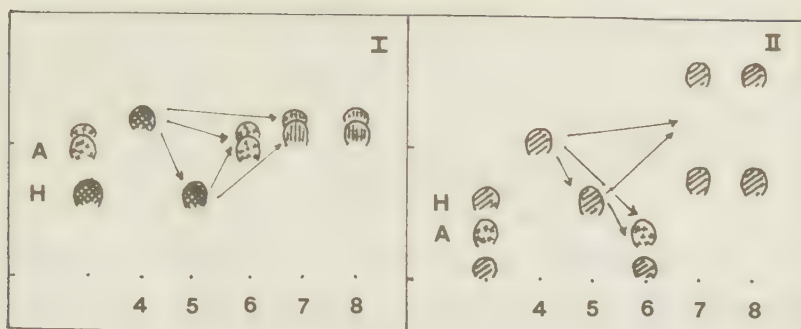
Tableau 15: Relevé des spectres UV de C_1

La substance C_1 accuse une valeur R_f de 0,59 dans le système chromatographique de base Polyamide MN-DC₁₁ - MeOH 90%. Sur couche mince, C_1 se trouve donc à la frontière entre la zone des monoglycosides flavoniques et celle des diglycosides flavoniques, autrement dit, dans la zone juste supérieure à celle des C-glucosides flavoniques acylés. La substance C_1 est probablement un monoglycoside de C-glycoside flavonique acylé par un acide phénolique.

L'hydrolyse par la β -glucosidase de C_1 libère une substance C_1 enz. dont le comportement chromatographique et les spectres UV sont identiques à ceux de la substance H: C_1 est donc un trans-féruloyl-2" isoorientine-O- β -D-glucoside.

L'hydrolyse acide de C_1 enz. fournit dans la phase butanolique de l'hydrolysate une substance $C_{1.1}$ s'isomérisant en $C_{1.2}$ (pseudo-cinétique) lesquelles sont identifiées comme étant respectivement l'isoorientine et l'orientine (co-chromatographie, spectre UV), et dans la phase étherée deux autres substances $C_{1.3}$ et $C_{1.4}$ correspondant aux isomères cis-trans de l'acide férulique (co-chromatographie et révélation). Par contre, aucun sucre n'est détecté. Ces résultats confirment, une fois de plus, l'identité de C_1 enz.

Il est à noter que l'hydrolyse acide de C_1 conduit aux mêmes produits d'hydrolyse que C_1 enz. ainsi qu'à du glucose (co-chromatographie et révélation).



I: Polyamide MN-DC₁₁

MeOH 90%

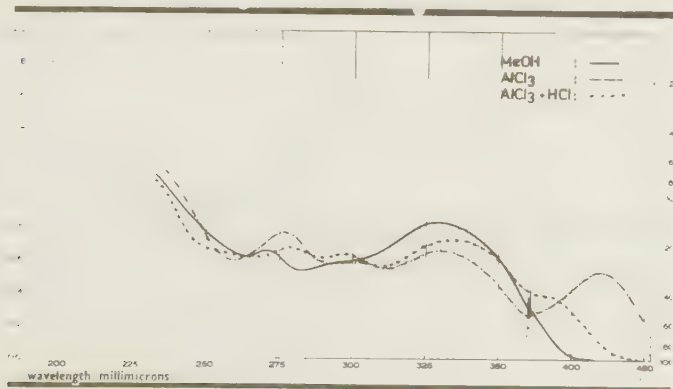
II: Cellulose Merck

AcOH 10%

Révélateur: KOH2N/MeOH + UV 350 nm

- | | |
|-----------------------------|---|
| 1: Substance H | 5: C ₁ hydrolyse enzymatique = C ₁ enz. |
| 2: Isoorientine | 6: C ₁ enz. hydrolyse acide, extrait n-BuOH |
| 3: Orientine | (C _{1.1} et C _{1.2}) |
| 4: Substance C ₁ | 7: C ₁ enz. hydrolyse acide extrait éthéré |
| | (C _{1.3} et C _{1.4}) |
| | 8: Acide férulique cis-trans |

Fig. 73: Chromatogramme de C₁ hydrolysé



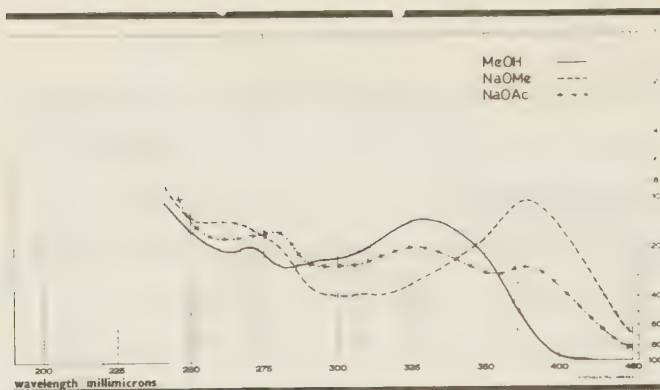


Fig. 74: Spectre UV de C_1 enz.

Il reste donc à déterminer la position d'attache du glucose. Au premier abord, étant donné que C_1 est un O-glucoside de la substance H et qu'en outre, il possède un substituant OR en position 4', la molécule de glucose est vraisemblablement attachée à cette position. Cette hypothèse est, dès lors, vérifiée par l'analyse des produits issus de l'hydrolyse acide du dérivé méthylé de C_1 .

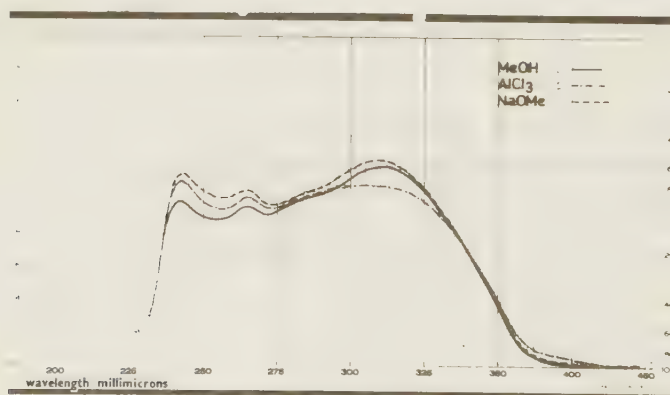


Fig. 75: Spectres UV du dérivé méthylé de C_1

La chromatographie sur couche mince a permis de détecter et d'identifier les substances C_{1m_2} et C_{1m_3} , isolées de la fraction étherée de l'hydrolysat, comme étant les isomères cis et trans de l'acide diméthylcaféique. Ainsi, le reste féruloyle n'est pas substitué. Une autre substance C_{1m_1} est obtenue de la fraction butanolique; le comportement chromatographique et les spectres UV sont identiques à ceux de la triméthyl-5,7,3' iso-orientine: l'unité de glucose se situe donc en position 4'.

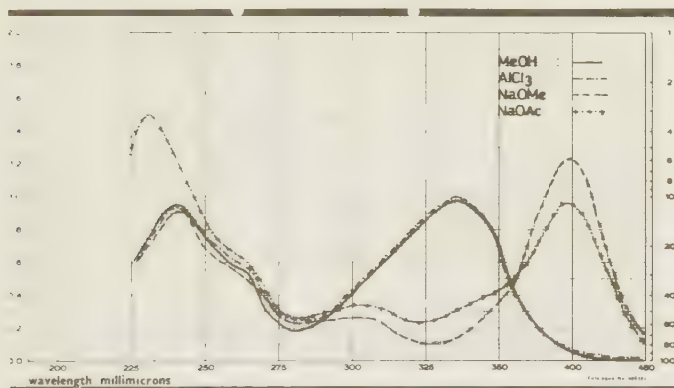


Fig. 76: Spectres UV de C_{1m_1}

Il est, à présent, essentiel de confirmer que la substance C_1 est un mono O-glucoside.

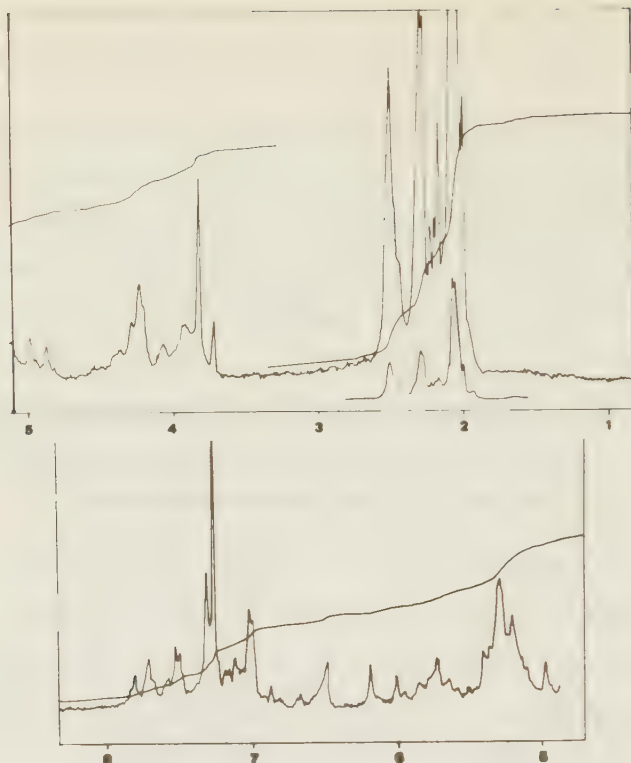


Fig. 77: Spectres ^1H -RMN¹⁾ à 90 MHz du dérivé acétylé de C_1
dans CDCl_3

L'analyse du spectre RMN montre que le dérivé acétylé de C_1 (préalablement recristallisé dans l'éthanol) renferme quelques impuretés. En effet, nous décelons dans le spectre quelques signaux auxquels nous ne pouvons donner d'attribution, notamment dans le domaine des protons aromatiques. Néanmoins, il nous est possible d'en tirer les renseignements suivants:

1) δ en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne

- pour la partie glucoside flavonique:

- 3 groupes acétoxyyles aromatiques dont deux à 2,51 ppm (singulet, Ac-5 et Ac-7) et un à 2,30 ppm (singulet, Ac-3'),
- 5 protons aromatiques dont un à 6,53 ppm (singulet, H-3), un à 7,07 ppm (doublet, $J=9\text{Hz}$, H-5'), un à 7,32 ppm singulet, H-8), un à 7,52 ppm (doublet, $J=2,5\text{Hz}$, H-2') et un à 7,76 ppm (double doublet mal résolu, $J=9\text{Hz}$, H-6'),
- 14 protons aliphatiques correspondant à deux unités de glucose acétylé entre 3,7 - 6,00 ppm dont un à 4,92 ppm (doublet, $J=10\text{Hz}$, H-1'),
- 7 groupes acétoxyyles aliphatiques dont un à 2,00 ppm (Singulet), trois à 2,06 ppm (singulet) et trois à 2,08 ppm (singulet), correspondant aux trois groupes du reste C-glucosidique (Ac-6'', Ac-3'' et Ac-4'') et aux quatre groupes du reste O-glucosidique (Ac-6''', Ac-2''', Ac-3''' et Ac-4''');

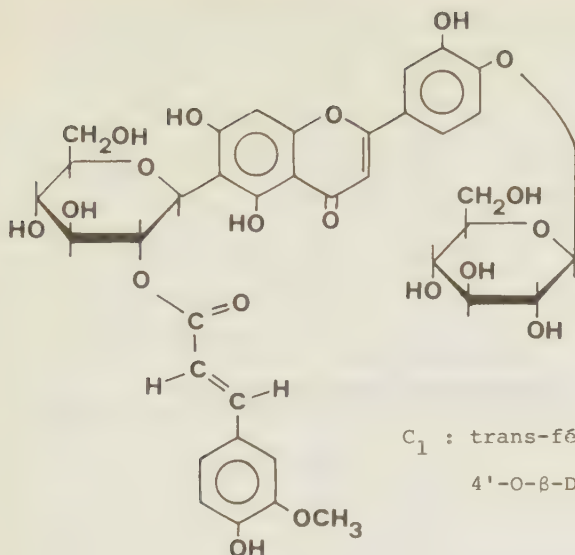
- pour la partie féruloyle:

- 1 groupe acétoxyyle aromatique à 2,28 ppm (singulet, Ac-4),

- 1 groupe méthoxyle aromatique à 3,82 ppm (singulet, MeO-3),
- 3 protons aromatiques entre 6,90 - 7,70 ppm (H-2, H-5 et H-6),
- 2 protons éthyléniques dont un à 6,10 ppm (doublet, $J=16\text{Hz}$, H- α) et un à 7,40 ppm (doublet, $J=16\text{Hz}$, H- β), formant un spectre du type Ax.

Sur la base du spectre, C_1 ne peut porter que deux restes glucosidiques, en l'occurrence un reste C- β -D-glucosyle substitué (H-1", $J=10\text{Hz}$) et un reste O- β -D-glucosyle (H-1"' étant masqué par les autres protons aliphatiques). Relevons que le proton aromatique H-5' de la substance C_1 est déplacé vers les champs forts ($\delta = 7,07$ ppm) par comparaison avec celui de la substance H ($\delta = 7,37$ ppm); ce qui confirme une fois de plus la substitution par le glucose en 4'. Notons enfin qu'aucun signal n'est présent dans le domaine $\delta = 1,70 - 1,95$ ppm: C_1 est un 6-C-glucoside flavonique substitué en 2", en l'occurrence par l'acide férulique qui possède la configuration trans.

Les démarches entreprises nous permettent de proposer, pour la substance C_1 , la structure: trans-féruloyl-2"isoorientine-4'-O- β -D-glucoside.



C_1 : trans-féruloyl-2'' isoorientine-4'-O-β-D-glucoside

5.1.5. SUBSTANCE C_2

Les spectres UV de C_2 dans le méthanol en présence des réactifs usuels [11], sont identiques à ceux de la substance H, la trans-féruloyl-2'' isoorientine. De ce fait, C_2 doit posséder dans sa structure, les mêmes chromophores que ceux de la substance H; autrement dit, le même schéma de substitution pour le squelette flavonique (tétrahydroxy-5,7,3',4' flavone) et le même reste acylé en l'occurrence le reste féruloyle.

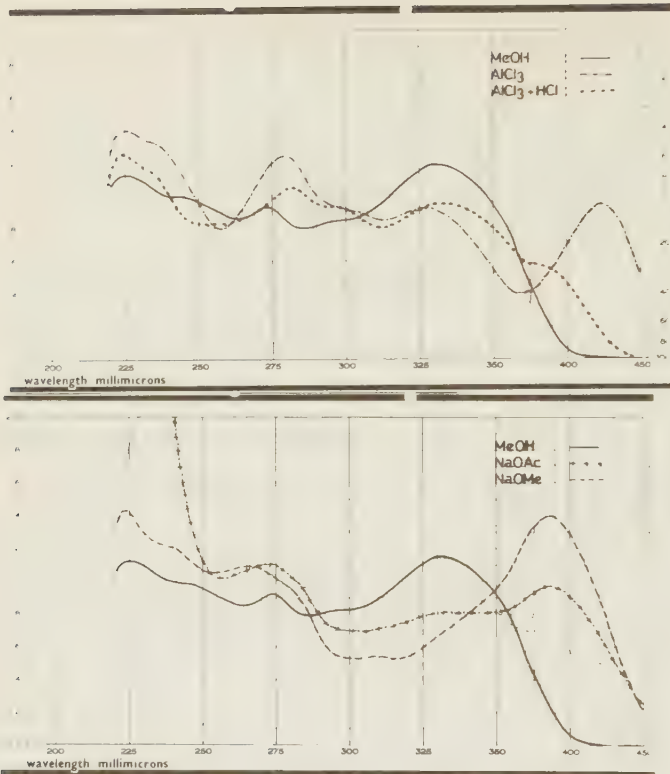


Fig. 78: Spectres UV de la substance C_2

Réactifs	Maximums (nm)			
MeOH	273	297sh	331	
NaOMe	266	280sh	310sh	385
NaOAc	273	282sh	332sh	385
AlCl ₃	281	302sh	328	424
AlCl ₃ /HCl	279	300sh	335	384sh

Tableau 16: Relevé des spectres UV de C₂

En effet, nous relevons dans le spectre de C₂ en présence de AlCl₃ deux maximums dans le domaine des longueurs d'onde 300 nm - 450 nm; l'un à 424 nm dû au groupe O-dihydroxyle en 3',4' et l'autre à 328 nm dû au reste féruloyle.

Les deux substances se différencient par leur comportement sur couche mince. C₂ de Rf¹⁾ 0,57 voisine de celui de la substance C₁ (Rf = 0,59) migre dans la zone des diglucosides flavoniques acylés alors que H de Rf¹⁾ = 0,32 se trouve dans celle des monoglucosides. Ainsi la substance C₂ serait un monoglucoside de la trans- feruloyl-2" isoorientine.

C₂ n'est pas affecté par l'enzyme β-glucosidase comme le prouvent le comportement chromatographique et les spectres UV

1) Polyamide MN-DC₁₁/MeOH 90%

du produit d'hydrolyse C_2 enz., lesquels sont identiques à la substance non traitée. Cela implique que C_2 ne porte pas de groupe O-glucosidique terminal.

L'acide chlorhydrique dilué coupe la molécule en plusieurs fragments en fournissant les produits $C_{2.1}$ et $C_{2.2}$ isolés de la phase butanolique de l'hydrolysate, les produits $C_{2.3}$ et $C_{2.4}$ de la phase étherée et un produit $C_{2.5}$ de la phase aqueuse. La CCM identifie $C_{2.3}$ et $C_{2.4}$ respectivement aux isomères cis-trans de l'acide férulique et $C_{2.5}$ au glucose. Quant aux deux autres produits, ils correspondent respectivement à l'isoorientine et à l'orientine (pseudo-cinétique, CCM, spectres UV).

A priori, C_2 est un isomère de H. Il s'agit donc de connaître l'ordre d'enchaînement des trois fragments libérés. Deux cas peuvent se présenter; soit le glucose et l'acide férulique sont rattachés au niveau des groupes hydroxyles du reste C-glucosyle à des positions différentes, soit l'acide est lié au glucose qui, lui, est fixé au reste C-glucosyle. La première possibilité est à rejeter puisqu'elle entre en désaccord avec les résultats issus de l'hydrolyse enzymatique, à moins que le glucose soit substitué par un groupe hydrolysable. Ce fait se traduirait par des répercussions sur le spectre IR de C_2 . Or il n'en est rien car, en effet, nous relevons les mêmes bandes de vibration dans les spectres IR de C_2 et de H.

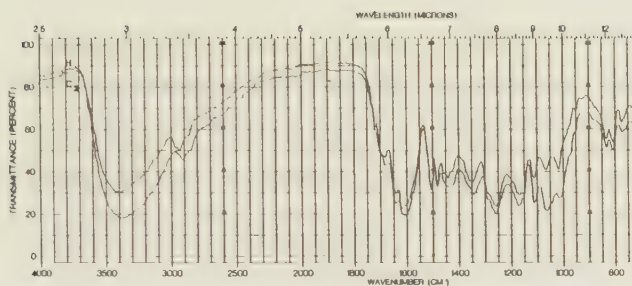
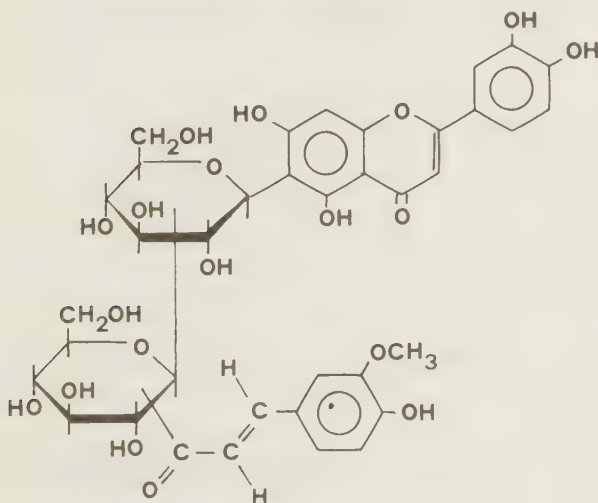


Fig. 79: Spectre IR des substances C_2 et H

Par manque de matériel, il ne nous est pas possible de poursuivre les démarches nécessaires à la détermination de la structure de la substance C_2 . Toutefois, en nous basant sur les données acquises, nous pouvons prévoir la structure du type: trans-féruloyl- X''' -O- β -D-glucosyl- X'' -isoorientine.



5.1.6. SUBSTANCE I

Le spectre UV de I dans le méthanol est caractéristique des dérivés flavoniques. La bande I à 348 nm suggère une forte oxygénation du cycle B, soit di- ou trihydroxylé. Les déplacements des bandes d'absorption provoqués par l'addition des réactifs usuels révèlent la présence de groupes hydroxyles en position 5, 3', et 4' et d'un groupe OR en 7 (pas de déplacement bathochrome de la bande II sous l'action de NaOAc). Aucune contradiction n'étant observée, il s'agit sans doute d'un dérivé flavonique non acylé.

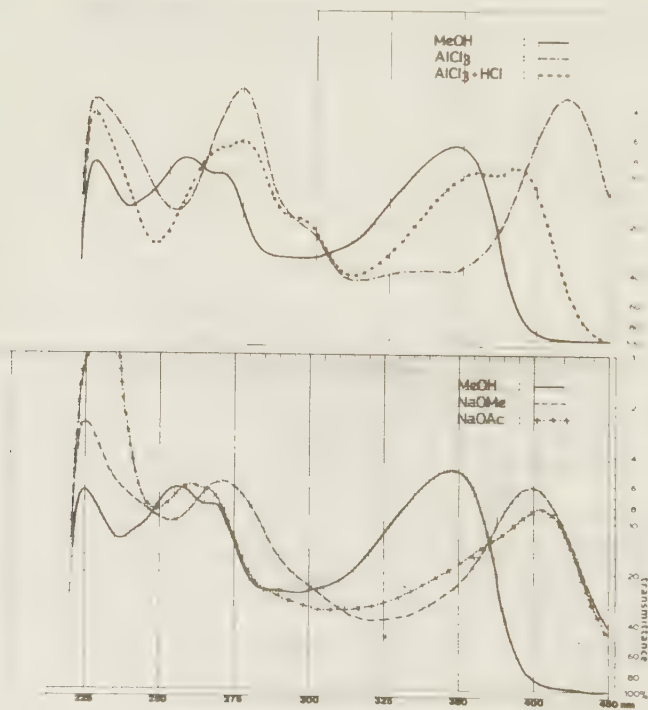


Fig. 80: Spectres UV de la substance I

Réactifs	Maximums (nm)				
MeOH	256	268sh	347		
NaOMe	265	300sh	390		
NaOAc	260	267sh	404		
AlCl ₃	275	298ah	328sh	426	
AlCl ₃ /HCl	265sh	275	295sh	358	386

Tableau 16: Relevé des spectres UV de la substance I

Le comportement chromatographique de la substance I ($R_f^{1)} = 0,35$) est celui d'un monoglucoside flavonique. Le reste osidique est probablement fixé en position 7 puisque I porte un groupe OR en cet endroit. Cette hypothèse est justifiée par l'analyse du produit I enz. issu de l'hydrolyse de I par la β -glucosidase. En effet, I enz. est identique à la lutéoline ²⁾ (tétrahydroxy-5,7,3',4' flavone) par ses spectres UV et son comportement chromatographique.

1) Polyamide MN-DC₁₁/MeOH 90%

2) Synthétisée selon Hatchins & Wheeler [28]

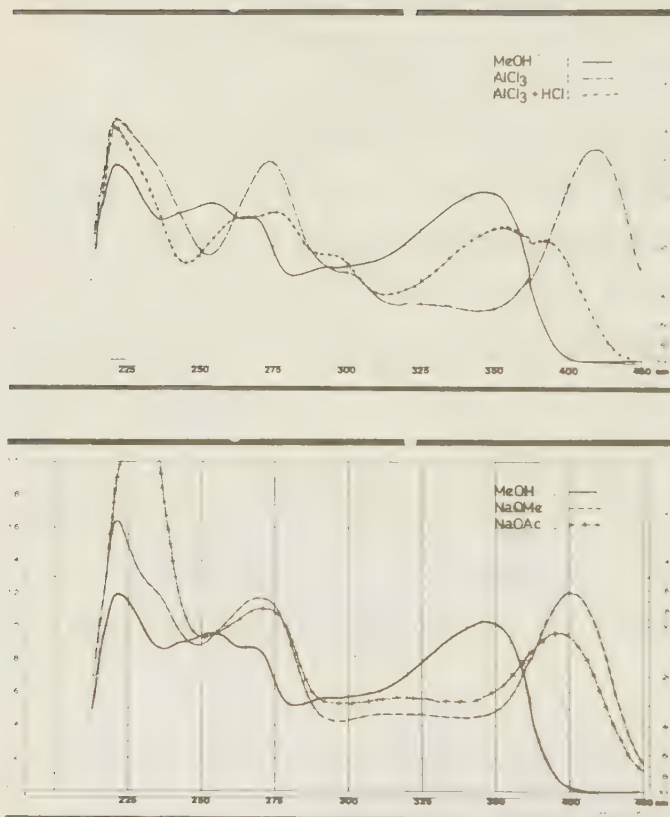


Fig. 81: Spectres UV de I enz.

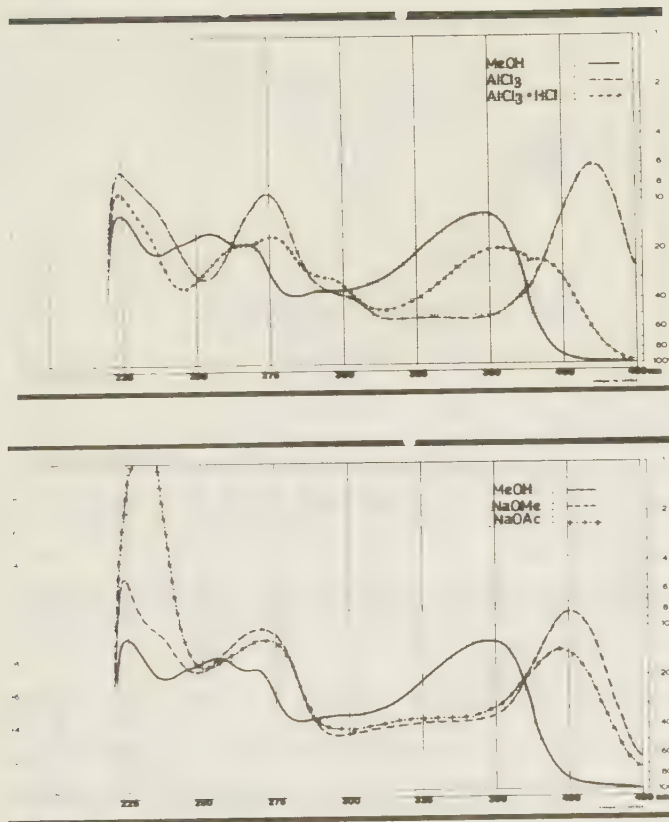


Fig. 82: Spectres UV de la lutéoline

Réactifs	Maximums (nm)				
<u>I enz.</u>					
MeOH	254	268	291sh	348	
NaOMe		270	320sh	400	
NaOAc		271	320sh	394	
AlCl ₃	274	302sh	325sh	419	
AlCl ₃ /HCl	267sh	276	295sh	356	384sh
<u>Lutéoline</u>					
MeOH	255	268	292sh	348	
NaOMe		271	320sh	400	
NaOAc		271	320sh	394	
AlCl ₃	274	302sh	327sh	420	
AlCl ₃ /HCl	267sh	276	295sh	356	384sh

Tableau 17: Relevé des spectres UV de I enz. et de la lutéoline

Dès lors, il apparaît que I est la 7-O-β-D-glucosyl lutéoline encore connue sous le nom de glucolutéoline ou cynaroside.

L'hydrolyse acide de I libère, d'une part, la lutéoline identifiée par CCM et les spectres UV et d'autre part le glucose identifié par CCM. En revanche, l'action de HCl sur le produit I enz. est sans effet.

Le dérivé méthylé de I est soumis à l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique. Il en résulte, dans la phase aqueuse, du glucose (CCM, révélation) et dans la phase butanolique, une substance Im dont les spectres UV dans le méthanol en présence de NaOAc indiquent la présence d'un groupe hydroxyle en 7. Le reste O-glucosidique est donc bien fixé à cette position.

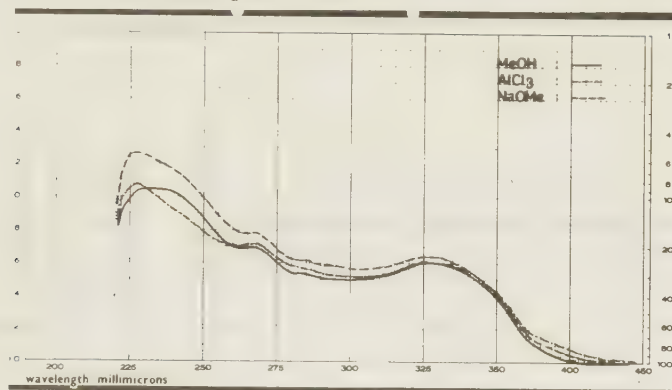
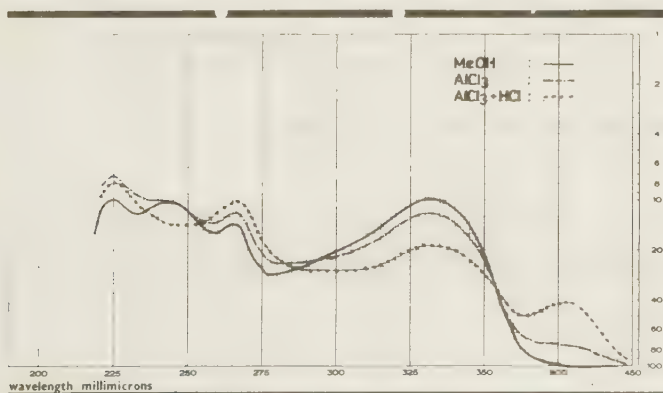


Fig. 83: Spectres UV du dérivé méthylé de I



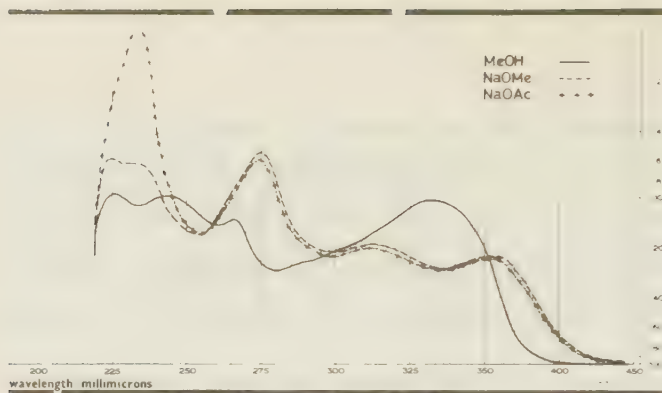
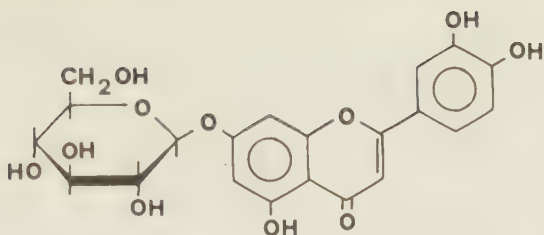


Fig. 84: Spectres UV de Im

Réactifs	Maximums (nm)			
MeOH	266		332	
NaOMe	274	312	354	
NaOAc	274	312	354	
AlCl ₃	266		332	
AlCl ₃ /HCl	267		332	406

Tableau 18: Relevé des spectres UV de Im

Les démarches entreprises pour déterminer la structure de la substance I aboutissent à la conclusion qu'il s'agit de la 7-O-β-D-glucosyl lutéoline.



I : 7-O-β-D-glucosyl lutéoline

Par défaut de matériel, il ne nous est pas possible de confirmer la structure proposée par la résonance magnétique nucléaire. Toutefois, les données analytiques de la substance I correspondent à celles de la littérature.

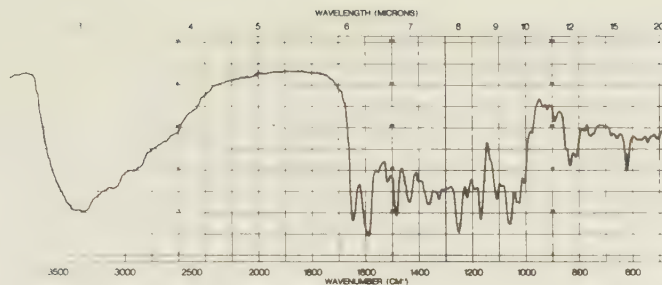


Fig. 85: Spectre IR de la substance I

5.2. SUBSTANCES DANS GENTIANA PUNCTATA L.

Nous avons isolé, dans Gentiana punctata L., huit substances dont trois, à savoir G, H et C₁, sont présentes dans Gentiana burseri Lapeyr.; les cinq autres, à savoir D, J, K, L et M, y étant absentes.

5.2.1. SUBSTANCE L

Le spectre UV de L dans le méthanol présente les bandes d'absorption caractéristiques des dérivés flavoniques. L'analyse des spectres effectués en présence de AlCl₃ et AlCl₃+HCl nous informe que L est porteur d'un groupe O-dihydroxyle ainsi que d'un groupe hydroxyle en position 5. En présence de NaOMe et de NaOAc, on peut

établir l'existence de groupes hydroxyles en position 7 et 4'. Cependant, la position de la bande I (329 nm) du spectre de L dans le méthanol est plutôt relative à une flavone à cycle B trioxygéné dont la position 4' est le siège d'une O-substitution (cf. tableau 2). Cette contradiction suppose que la substance L est différente d'une flavone classique, probablement du type cinnamoylflavone.

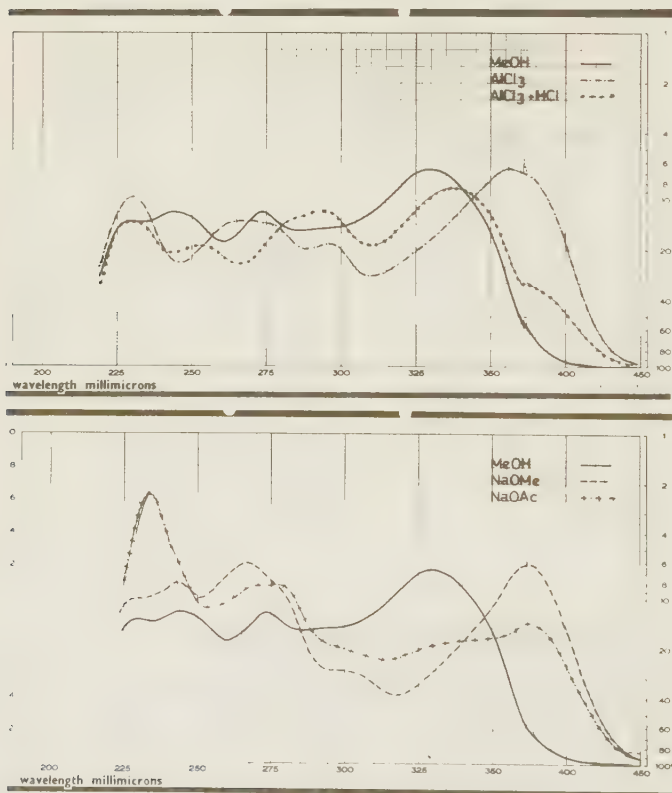


Fig. 86: Spectres UV de la substance L

Réactifs	Maximums (nm)			
MeOH		273		329
NaOMe	267	279sh	300sh	374
NaOAc	270	278	330sh	374
AlCl ₃	265	277	296	362
AlCl ₃ /HCl	283sh	295	337	384sh

Tableau 20: Relevé des spectres UV de L

Le groupe O-dihydroxyle que porte la substance L ne peut se trouver sur le cycle A de la flavone puisque celle-ci ne subit pas de décomposition sous l'action des réactifs basiques comme c'est le cas pour la baicaléine (trihydroxy-5,6,7 flavone) et la norwogonine (trihydroxy-5,7,8 flavone) [11]. Une autre éventualité à envisager est la fixation de ce groupe O-dihydroxyle sur le cycle B. Les schémas d'oxydation possibles sont indiqués dans le tableau 21.

Flavones	Schéma de substitution								MeOH+AlCl ₃ Bande I (nm)
	Noyau A			Noyau B					
	5	6	7	2'	3'	4'	5'		
Isoorientine	OH	C-gluc	OH		OH	OH		424	
Isoaffinétine* [27]	OH	C-glyc	OH		OH	OH	OH	420	
[17]	OH		OH		OH	OH	OMe	426	
[30]	OH		OH	OH		OH	OH	441	

*décomposé par les réactifs basiques

Tableau 21: Bande I des spectres UV dans MeOH+AlCl₃ de quelques flavones à cycle B dihydroxylé

L'examen du tableau 21 montre que la bande I des spectres dans MeOH+AlCl₃ des flavones à cycle B dihydroxylé absorbe au plus bas à 420nm. De ce fait, si le groupe O-dihydroxyle était localisé sur le cycle B du squelette flavonique de L, nous devrions observer, dans le spectre MeOH+AlCl₃ de L, une deuxième bande d'absorption aux environs des 420 nm comme c'est le cas pour les substances G et H. Or il n'en est rien. Ainsi, le groupe O-dihydroxyle est plutôt relatif à un éventuel reste cinnamoylé.

En résumé, les spectres UV attribuent à la substance L un squelette flavonique hydroxylé en 5,7 et éventuellement en 4'

auquel est substitué éventuellement un reste cinnamoyle porteur d'un groupe O-dihydroxyle vraisemblablement le caféoylo.

Chromatographié sur couche mince avec le système de base (polyamide MeOH/H₂O 9:1) la substance L montre un R_f (0,54) typique de monoglycoside de cinnamoyl C-glucosyl flavone, lequel est voisin de celui de l'isoorientine (R_f: 0,51). Cette similitude de R_f peut prêter à confusion si l'on ne fait pas usage de révélateurs tels que KOH₂N/MeOH (cf. chromatogramme de la fig. 18).

La substance L mise en présence du β -glucosidase en milieu tamponné se transforme en produit L enz. dont le comportement chromatographique et les spectres UV sont en tout point identiques à ceux de la substance G (O-glucoside du trans-caféoyl-2" isoorientine).

Le reste acyle est donc lié à l'isoorientine par l'intermédiaire d'une fonction ester laquelle vibre à 1685 cm^{-1} comme le montre le spectre IR de la substance L.

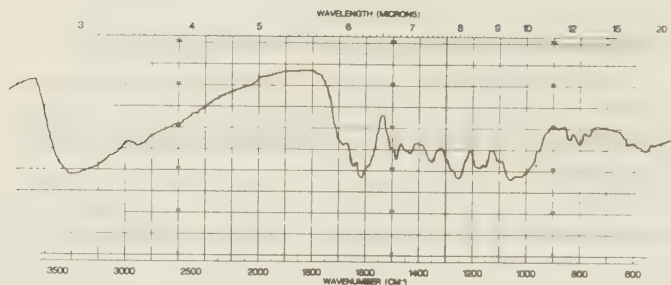
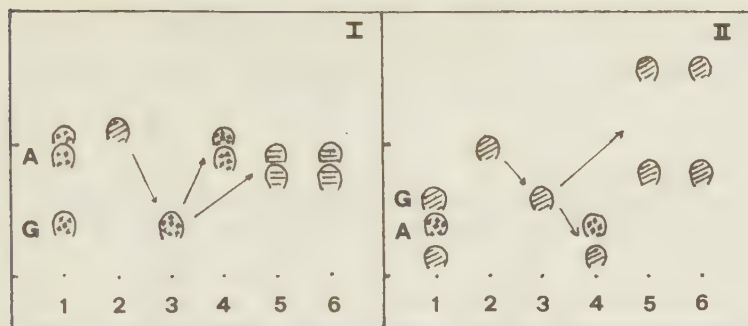


Fig. 87: Spectre IR de la substance L

L'action de HCl dilué sur L. enz. conduit à une substance L_1 ainsi qu'à son isomère L_2 , lesquelles sont identifiées, par CCM et spectres UV, respectivement à l'isoorientine et à l'orientine. Deux autres produits sont aussi obtenus et correspondent aux isomères cis-trans de l'acide caféique. Ces résultats constituent une preuve supplémentaire de l'identité de L enz.



I: Polyamide MN-DC₁₁

MeOH 90%

II: Cellulose Merck

AcOH 10%

Révélateur: KOH₂N/MeOH + UV 350 nm

- 1: Orientine + isoorientine (A) et substance G
- 2: Substance L
- 3: L enz.
- 4: L enz. hydrolyse acide, extrait butanolique (L₁, L₂)
- 5: L enz. hydrolyse acide, extrait éthéré (L₃, L₄)
- 6: Acide caféique cis-trans

Fig. 88: Chromatogramme de L hydrolysé

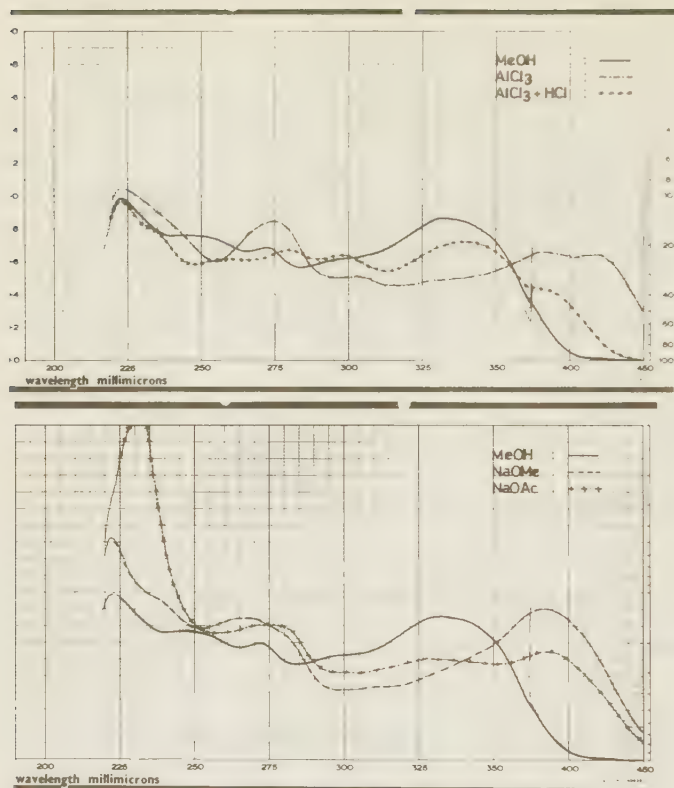


Fig. 89: Spectres UV de L. enz.

Il reste à localiser la position d'attache du glucose. Les informations recueillies jusqu'à présent ne concordent pas pour préciser celle-ci. A priori, on pourrait suggérer la substitution en 3'. En effet, avant l'hydrolyse enzymatique, nous notons l'absence du groupe O-dihydroxyle alors qu'après traitement, la présence d'un tel groupe est certaine (G est le produit d'hydrolyse). D'autre part, le spectre UV en présence du méthylate

laissait supposer le OH 4' libre. Pour vérifier cette hypothèse, le dérivé méthylé de L est soumis à l'action dégradative de HCl dilué.

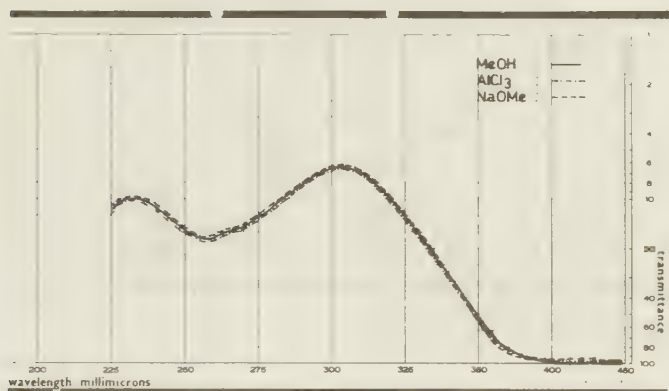


Fig. 90: Spectres UV du dérivé méthylé de L

Nous obtenons dans la phase étherée de l'hydrolysate deux produits Lm_2 et Lm_3 lesquels correspondent chromatographiquement aux isomères cis et trans de l'acide diméthyl caféique: le reste caféoylé n'est le siège d'aucune substitution. De la phase butanolique, nous isolons un produit Lm_1 qui est identifié par CCM à la triméthyl-5,7,3' isoorientine; les spectres UV en constituent une preuve convaincante. Ainsi la molécule du glucose est localisée sur le squelette flavonique en 4' contrairement à nos prévisions qui la situent en 3'. Cette confusion est due à l'interprétation erronée du spectre UV de L en présence de NaOMe. Le déplacement bathochrome attribué au reste 4' OH est en fait attri-

uable au OH para du reste caféoylé.

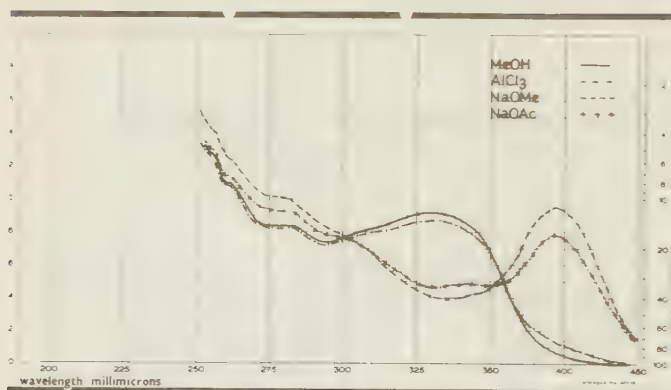


Fig. 91: Spectres UV de Lm_1

Ainsi, il s'avère que la substance L est le trans-caféoyl-2'' isoorientine-4'-O- β -D-glucoside. La confirmation est apportée par le spectre RMN du dérivé acétylé.

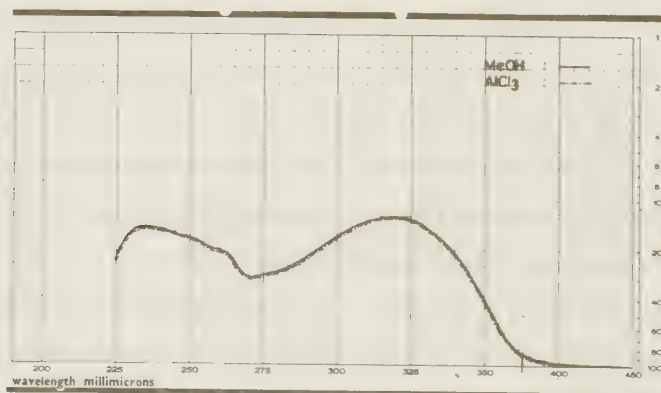
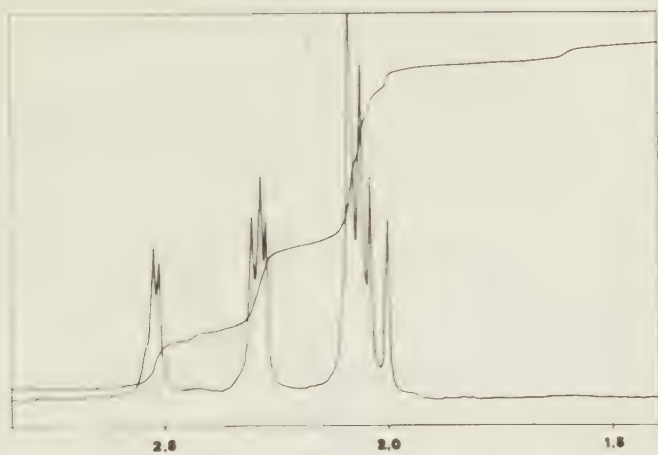
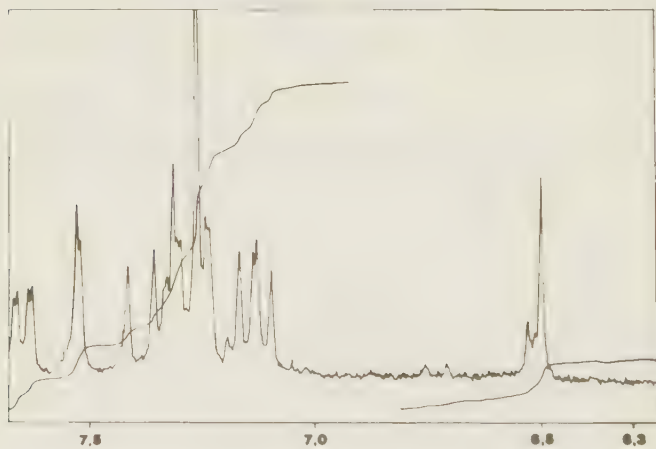
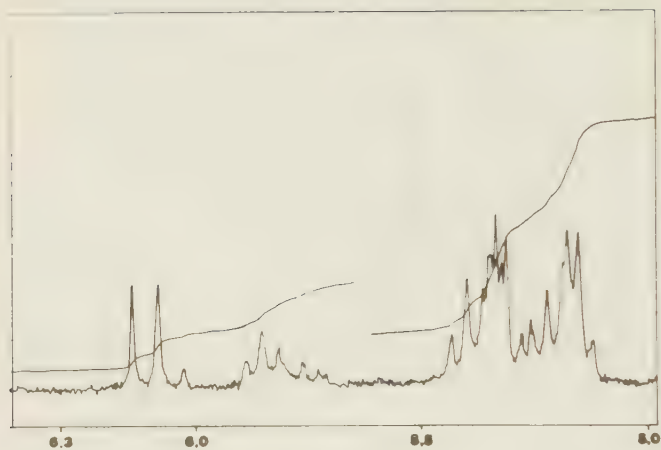


Fig. 92: Spectres UV du dérivé acétylé de L





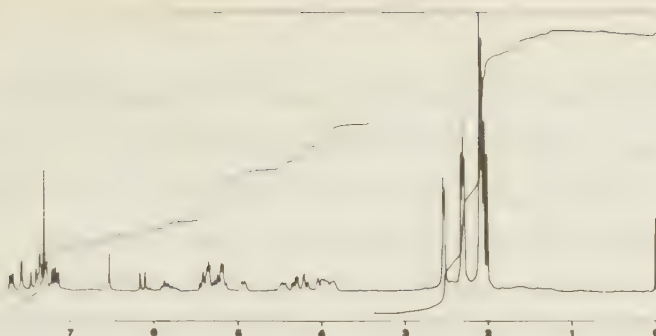


Fig. 93: Spectres $^1\text{H-RMN}^{1)}$ à 270 MHz du dérivé acétylé de L dans CDCl_3

Nous relevons dans le spectre RMN du dérivé acétylé de L:

- pour la partie glucoside flavonique:

- 3 groupes acétoxyles aromatiques dont deux à 2,52 ppm (singulet, Ac-5 et Ac-7) et un à 2,30 ppm (singulet, Ac-3'),
- 5 protons aromatiques dont un à 6,50 ppm (singulet, H-3), un à 7,31 ppm (singulet, H-8), un à 7,52 ppm (doublet, $J=2\text{Hz}$, H-2'), un à 7,66 ppm (double doublet, $J=2$ et 9Hz , H-6') et un entre 7,10 - 7,30 ppm (H-5'),
- 7 groupes acétoxyles aliphatiques dont un à 2,00 ppm, un à 2,03 ppm, deux à 2,05 ppm et trois à 2,08 ppm, correspondant

¹⁾ δ en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne

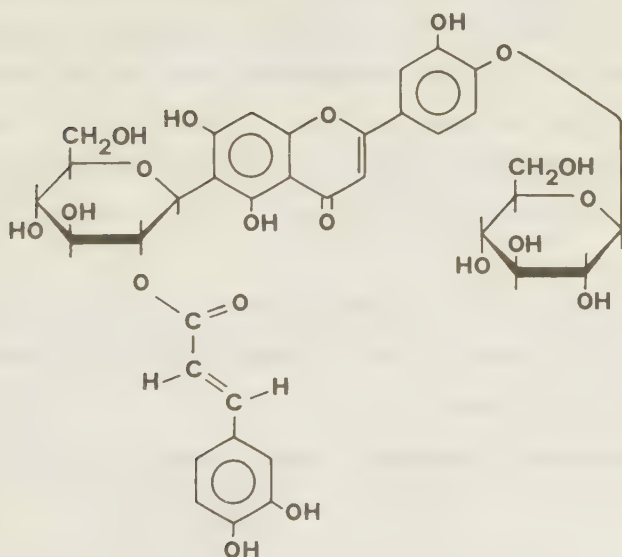
aux trois groupes acétoxyles du reste C-glucosyle et aux quatre groupes acétoxyles du reste O-glucosyle,

- 14 protons aliphatiques correspondant à deux unités de glucose acétylé entre 3,80 - 5,90 ppm dont un à 4,90 ppm (doublet, $J=10\text{Hz}$, H-1") et un à 4,16 ppm (doublet, $J=11\text{Hz}$, H-1'");
- pour la partie caféoyle:
 - 2 groupes acétoxyles aromatiques dont un à 2,27 ppm (singulet, Ac-3) et un à 2,28 ppm (singulet, Ac-4),
 - 3 protons aromatiques entre 7,10 - 7,30 ppm (H-2, H-5 et H-6),
 - 2 protons éthyléniques dont un à 6,10 ppm (doublet, $J=16\text{Hz}$, H- α) et un à 7,38 ppm (doublet, $J=16\text{Hz}$, H- β) formant un spectre du type Ax.

Nous observons l'absence du signal Ac-2" dans le domaine 1,80 - 1,83 ppm: le caféoyle est en 2". D'autre part, le signal du proton H-5' est déplacé vers les champs hauts (7,10 - 7,30 ppm) comparé à celui de son aglucone le trans-caféoyl-2" iso-orientine qui résonne à 7,41 ppm; ce déplacement confirme la

substitution en position 4'. Les configurations β et trans sont attribuées respectivement aux unités de glucose ($J_{H-1''}=10\text{Hz}$, $J_{H-1'''}=11\text{Hz}$) et au reste caféoyl ($J_{H-\alpha,H-\beta}=16\text{Hz}$).

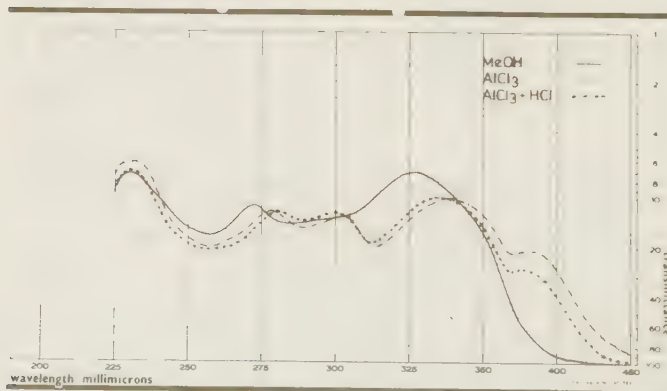
Les résultats obtenus sont en parfait accord pour proposer la structure de trans-caféoyl-2'' isoorientine-4'-O- β -D-glucoside.



5.2.2. SUBSTANCE M

La substance M présente un spectre UV typique de dérivé flavonique. La bande I (327 nm) du spectre de M dans le méthanol est révélatrice d'un cycle B O-substitué en position 4' (cf. tableau 2). Or, la modification de la bande causée par le réactif NaOMe localise un groupe hydroxyle à cette position. Nous décelons ainsi une contradiction qui nous incite à considérer la substance M comme étant un dérivé cinnamoylflavonique. Les déplacements des bandes d'absorption engendrés par les réactifs usuels assignent des groupes hydroxyles en position 5 et 7 tout en excluant la présence d'un groupe O-dihydroxyle.

Nous retiendrons pour la substance M la structure d'une trihydroxy-5,7,4' flavone acylée par un cinnamoyle ne portant pas de groupe O-dihydroxyle.



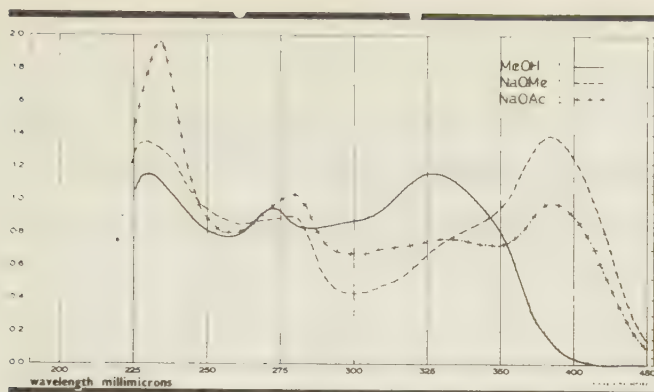


Fig. 94: Spectres UV de la substance M

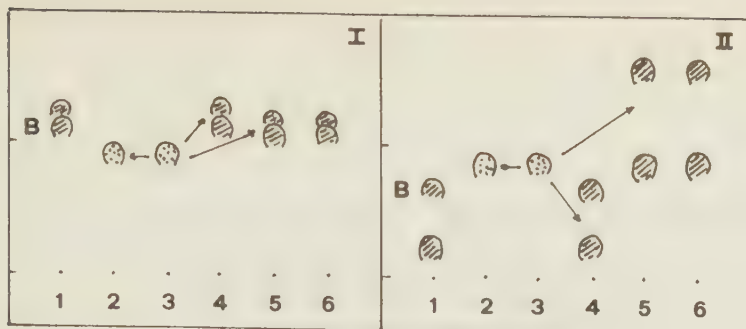
Réactifs	Maximums (nm)			
MeOH	272		327	
NaOMe	279	330sh	384	
NaOAc	280	330sh	384	
AlCl ₃	279	302	338	380sh
AlCl ₃ /HCl	280	300	335	380sh

Tableau 22: Relevé des spectres UV de la substance M

La substance M possède un $R_f^{1)}$ (0,46) qui la place dans la zone de migration des cinnamoyl-C-glucosyl flavones et qui est proche de celui de l'isoorientine ($R_f=0,51$). Cependant, M se différencie par sa réaction colorée (jaune) vis à vis du révélateur $KOH_2N/MeOH$, l'isoorientine étant orange.

La substance M n'accuse aucune modification face à la β -glucosidase (CCM, spectres UV). Toutefois, elle se dégrade dans une solution diluée de HCl . Il en résulte les produits M_3 et M_4 (phase étherée) qui sont identifiés par CCM aux isomères cis et trans de l'acide férulique et un produit M_1 qui s'isomérisse en M_2 (phase butanolique) lesquels correspondent respectivement à l'isovitexine et à la vitexine sur la base des comportements chromatographiques et des spectres UV. Aucun sucre n'étant décelé, la substance M est vraisemblablement une féruloylisovitexine.

¹⁾ Polyamide MN-DC₁₁ / $MeOH-H_2O$ (9:1)



I: Polyamide MN-DC₁₁
MeOH 90%

II: Cellulose Merck
AcOH 10%

Révélateur: KOH₂N/MeOH + UV 350 nm

1: Isovitexine (B) et vitexine

2: M hydrolyse enzymatique

3: Substance M

4: M hydrolyse acide, extrait butanolique (M_1 , M_2)

5: M hydrolyse acide, extrait éthéré (M_3 , M_4)

6: Acide férulique cis-trans

Fig. 95: Chromatogramme de M hydrolysé

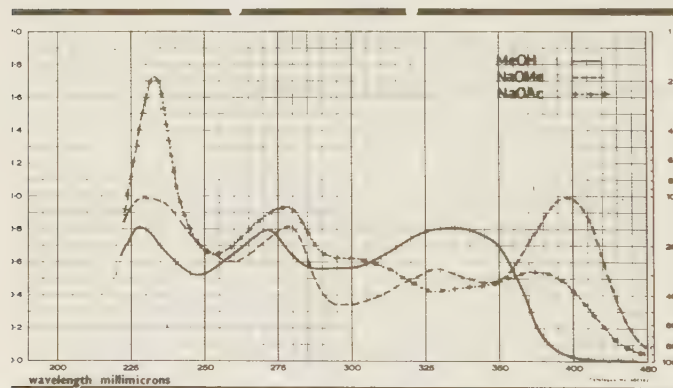
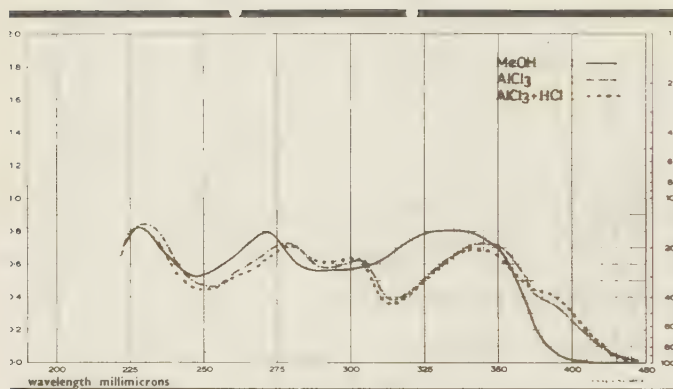


Fig. 96: Spectres UV de M_1 , M_2

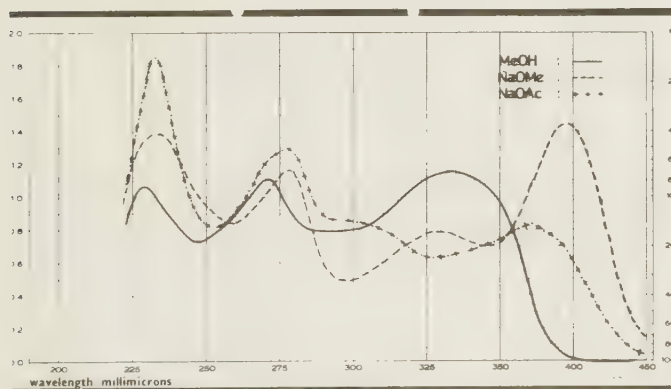
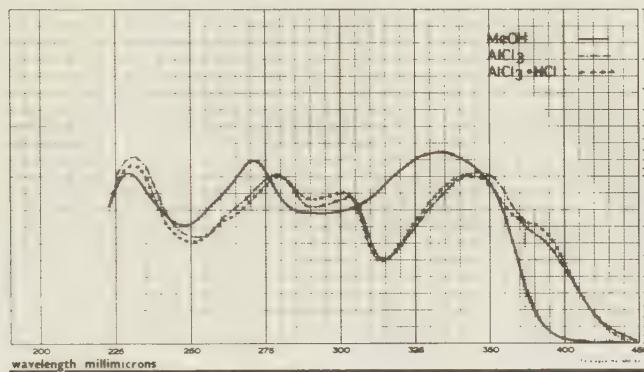


Fig. 97: Spectres UV de isovitexine et vitexine¹⁾

1) mélange obtenu par isomérisation de l'isovitexine

Réactifs	Maximums (nm)							
	<u>M₁ + M₂:</u>				<u>Isovitexine + vitexine:</u>			
MeOH	273		336		273			
NaOMe	280	335sh	398		280	335sh	399	
NaOAc	279	300sh	378		278	300sh	377	
AlCl ₃	280	304sh	350	380sh	280	304sh	350	380sh
AlCl ₃ /HCl	282	303sh	347	380sh	281	302sh	347	380sh

Tableau 23: Relevés des spectres UV de M₁ + M₂ et Isovitexine
+ vitexine

Le spectre IR de la substance M montre une bande de vibration à 1715 cm^{-1} relative à une fonction ester: le reste féru-loyle est donc rattaché à l'isovitexine par l'intermédiaire de cette fonction.

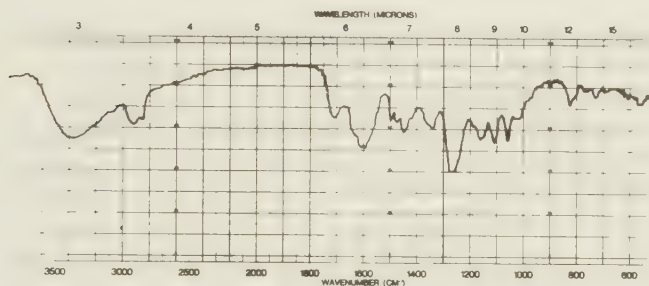


Fig. 98: Spectre IR de la substance M

Quant à la position d'attache, elle est déterminée par le spectre ^1H -RMN du dérivé acétylé de M.

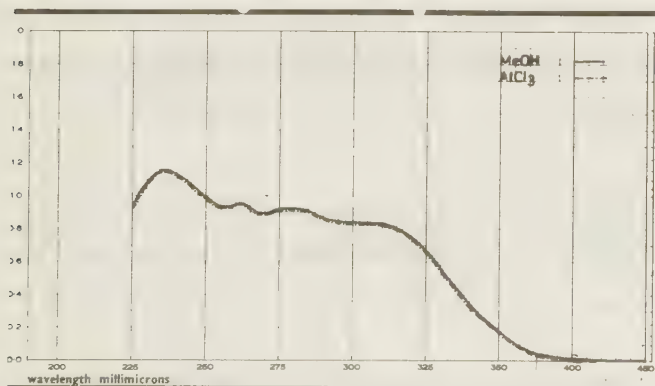


Fig. 99: Spectres UV du dérivé acétylé de M

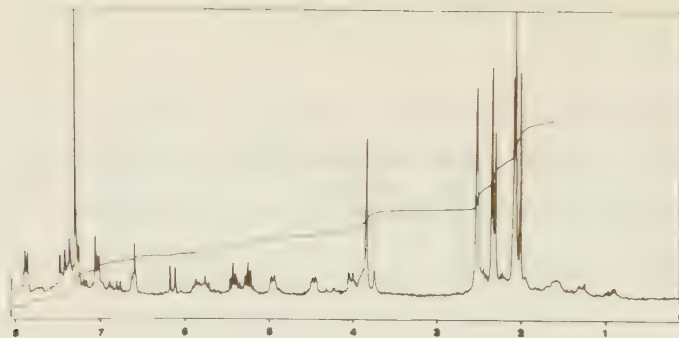


Fig. 100: Spectre ^1H -RMN à 270 MHz¹⁾ du dérivé acétylé de M dans CDCl_3

Dans le spectre, nous relevons:

- pour la partie C-glucoside flavonique:

- 3 groupes acétoxyyles aromatiques dont un à 2,34 ppm (singulet, Ac-4') et deux à 2,52 ppm (singulet, Ac-5 et Ac-7),
- 6 protons aromatiques dont un à 6,56 ppm (singulet, H-3), deux à 7,25 ppm (doublet, $J=9\text{Hz}$, H-3' et H-5'), un à 7,32 ppm (singulet, H-8) et deux à 7,87 ppm (doublet, $J=9\text{Hz}$, H-2' et H-6'),
- 3 groupes acétoxyyles aliphatiques dont un à 2,01 ppm (singulet, Ac-6"), un à 2,07 ppm (singulet, Ac-3") et un à 2,08 ppm (singulet, Ac-4"),
- 7 protons aliphatiques entre 3,70 - 5,90 ppm dont un à 4,94

¹⁾ δ en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne

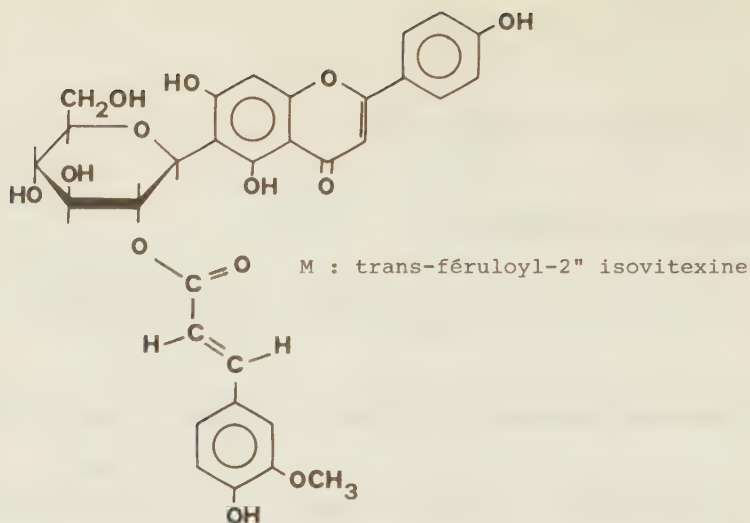
ppm (doublet, $J=10\text{Hz}$, H-1");

- pour la partie féruloyle:

- un groupe acétoxyle aromatique à 2,29 ppm (singulet, Ac-4),
- un groupe méthoxyle aromatique à 3,82 ppm (singulet, MeO-3),
- trois protons aromatiques entre 7,00 - 7,30 ppm (multiplet, H-2, H-5, H-6),
- deux protons éthyléniques dont un à 6,03 ppm (doublet, $J=16\text{Hz}$, H- α) et un à 7,33 ppm (doublet, $J=16\text{Hz}$, H- β) formant un spectre du type Ax.

Ces constantes de couplage relatives aux protons éthyléniques H- α , H- β et au proton anomérique H-1" nous permettent d'attribuer la configuration trans pour le reste féruloyle et la configuration β pour le reste C-glucosyle. L'absence de tout signal acétoxyle dans le domaine 1,77 - 1,83 ppm localise l'acylation en position 2".

En conclusion, nous proposons pour la substance M la structure de trans-féruloyl-2"-isovitexine.



5.2.3. SUBSTANCE K

Les spectres UV de la substance K dans le méthanol nous informent qu'il s'agit d'un dérivé flavonique. Cependant, nous y décelons la même contradiction déjà rencontrée dans les spectres de la substance M. De ce fait, une structure de cinnamoyl-flavone est à envisager aussi.

L'usage de réactifs usuels permet de localiser des groupes hydroxyles en position 5 et 7 du squelette flavonique tout en précisant l'absence de tout groupe O-dihydroxyle. Néanmoins, une indétermination demeure quant à la présence ou l'absence d'un groupe hydroxyle en 4'. En effet, la bande I du spectre en présence de NaOMe ne subit ni une augmentation de l'intensité caractéristique d'un hydroxyle en 4', ni une diminution due à un groupe O-substitué en 4', mais conserve, en fait, la même intensité que celle de la bande I du spectre dans le méthanol.

Ainsi, la substance K est un dérivé cinnamoyl-flavonique dihydroxylé en position 5 et 7 et ne portant pas de groupe O-di-hydroxyle.

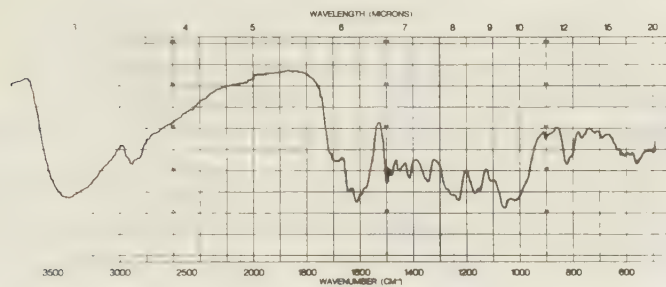
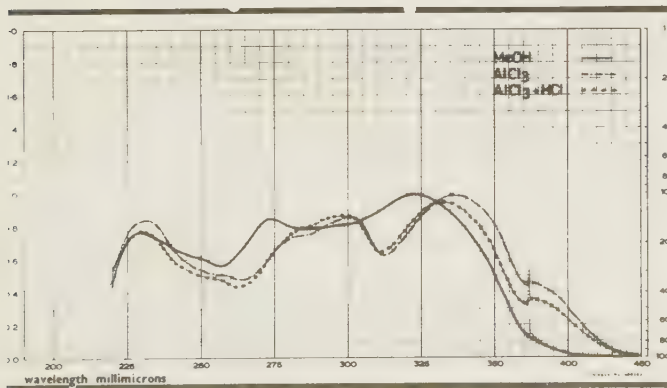


Fig. 101: Spectre IR de la substance K



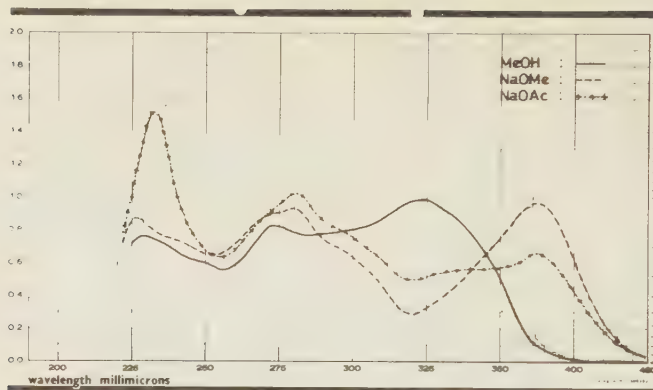


Fig. 102: Spectres UV de la substance K

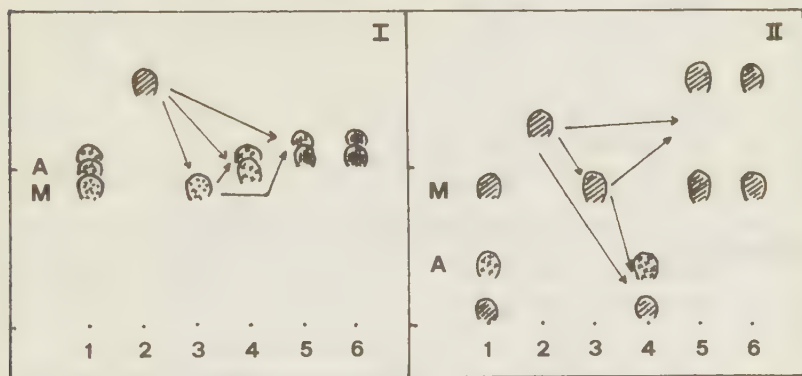
Réactifs	Maximums (nm)			
MeOH		274		322
NaOMe	270sh	280	300sh	372
NaOAc	280	300	335sh	372
AlCl ₃	281sh	301	336	380sh
AlCl ₃ /HCl	284sh	298	332	380sh

Tableau 24: Relevés des spectres UV de la substance K

Dans le système chromatographique de base, la substance K migre avec un R_f (0,78) intermédiaire entre celui de l'isoorientine 4'-O-glucoside (substance E, R_f = 0,80) et celui de l'iso-orientine-2"-O-glucoside (substance J, R_f = 0,74). La substance K est vraisemblablement un glucoside de cinnamoyl-C-glucosyl flavone.

La traitement de K avec le β -glucosidase fournit un produit K enz. identifié par son comportement chromatographique et ses

spectres UV comme étant la substance M: il s'agit donc d'un O-glucoside du trans-féruloyl-2" isovitexine. L'identité de K enz. est encore vérifiée par l'analyse des produits issus de son hydrolyse acide, laquelle conduit aux produits K_1 et K_2 correspondant respectivement à l'isovitexine et à la vitexine (CCM et spectres UV) et aux produits K_3 et K_4 correspondant respectivement aux isomères cis et trans de l'acide férulique (CCM). Quant à l'hydrolyse acide de la substance K, celle-ci mène aux quatre produits précités (CCM et spectres UV) ainsi qu'à du glucose (CCM).



I: Polyamide MN-DC₁₁
MeOH 90%

II: Cellulose Merck
AcOH 10%

Révélateur: KOH₂N/MeOH + UV 350 nm

- 1: Orientine, isoorientine A et substance M
- 2: Substance K
- 3: K hydrolyse enzymatique (K enz.)
- 4: K hydrolyse acide, extrait butanolique (K_1 , K_2)
- 5: K hydrolyse acide, extrait étheré (K_3 , K_4)
- 6: Acide férulique cis-trans

Fig. 103: Chromatogramme de K hydrolysé

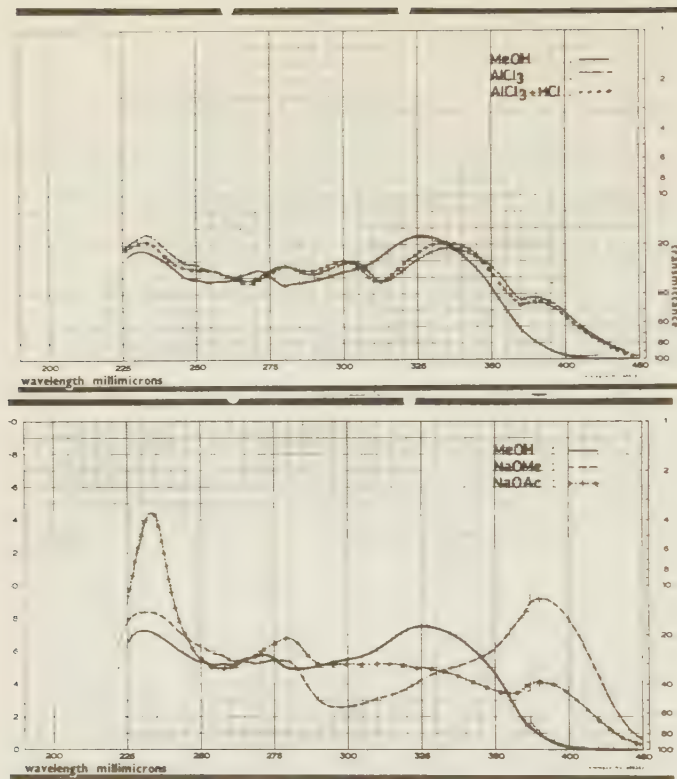


Fig. 104: Spectres UV de K enz.

La méthylation suivie de l'hydrolyse acide de la substance K conduit à deux produits Km_2 et Km_3 dont les comportements chromatographiques sont en tout point identiques aux isomères cis et trans de l'acide diméthylcaféique. Un autre produit Km_1 est aussi obtenu; celui-ci présente les mêmes caractéristiques chromatographiques et spectrales que la diméthyl-5,7 isovitexine résultant de la méthylation suivie de l'hydrolyse acide de l'isovitexine 4'-O-glucoside [2]. Ces résultats imposent certainement

une O-substitution du carbone 4' du dérivé flavonique, en l'occurrence par le reste osidique, le féruloyl n'étant pas substitué. Il s'avère que la substance K est un O-glucosyl-4'-trans-féruloyl-2" isovitexine.

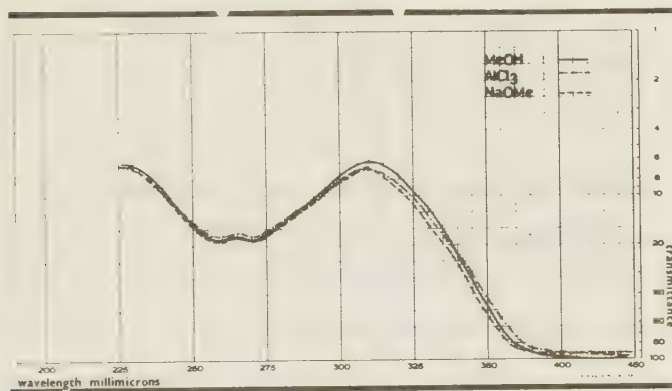


Fig. 105: Spectres UV du dérivé méthylé de K

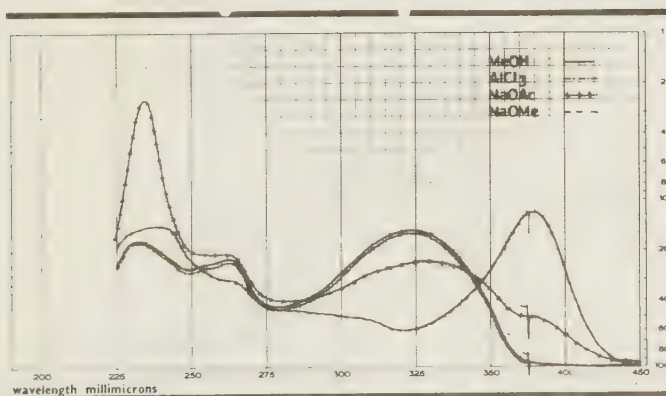


Fig. 106: Spectres UV de Km₁

Réactifs	Maximums (nm)					
	<u>Km₁</u>			<u>Diméthyl-5,7-isovitexine</u>		
MeOH	262		325	263		326
NaOMe	264	305sh	379	264	307sh	379
NaOAc	264	305sh	379	264	307sh	379
AlCl ₃	262		325	263		326

Tableau 25: Relevé des spectres UV de Km₁ et du diméthyl-5,7 isovitexine

La résonance des protons du dérivé acétylé de la substance K nous permettra de déterminer le nombre de sucres et par la suite, de confirmer la structure proposée.

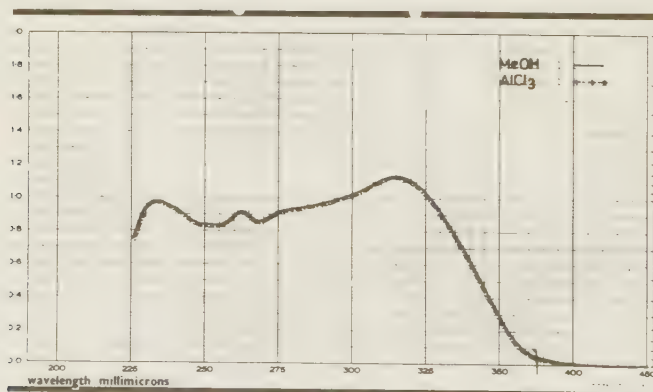
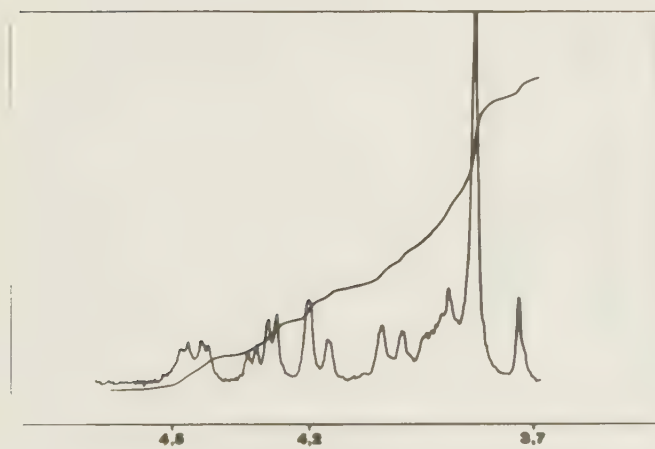
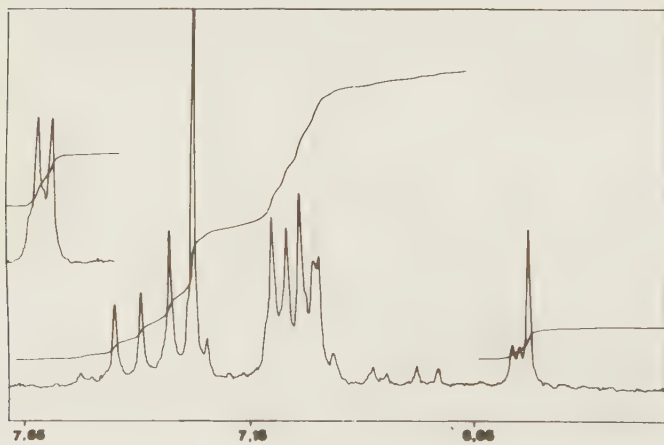
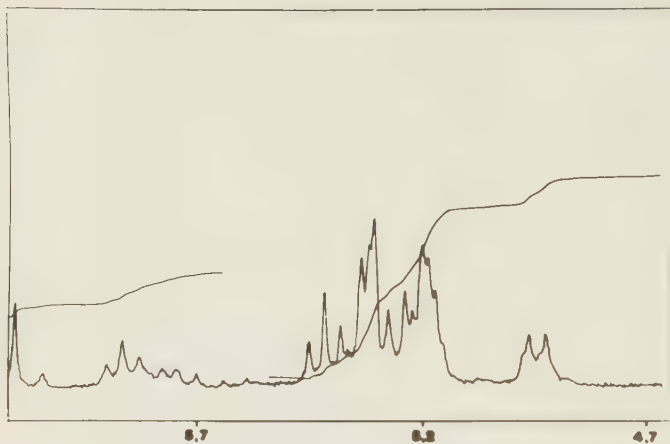


Fig. 107: Spectres UV du dérivé acétylé de K





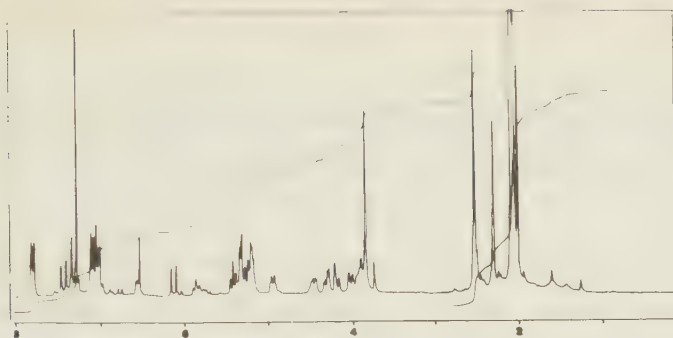


Fig. 108: Spectres $^1\text{H-RMN}^{1)}$ à 270 MHz du dérivé acétylé de la substance K dans CDCl_3

L'analyse du spectre $^1\text{H-RMN}$ du dérivé acétylé de la substance K révèle:

- pour la partie glucoside flavonique:

- 2 groupes acétoxyles aromatiques à 2,52 ppm (singulet, Ac-5 et Ac-7),
- 6 protons aromatiques dont un à 6,52 ppm (singulet, H-3), deux à 7,07 ppm (doublet, $J=9\text{Hz}$, H-3' et H-5'), un à 7,32 ppm (singulet, H-8) et deux à 7,77 ppm (doublet, $J=9\text{Hz}$, H-2' et H-6'),
- 7 groupes acétoxyles aliphatiques dont un à 2,00 ppm, un à 2,05 ppm, trois à 2,07 ppm et deux à 2,08 ppm correspondant

¹⁾ δ en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne

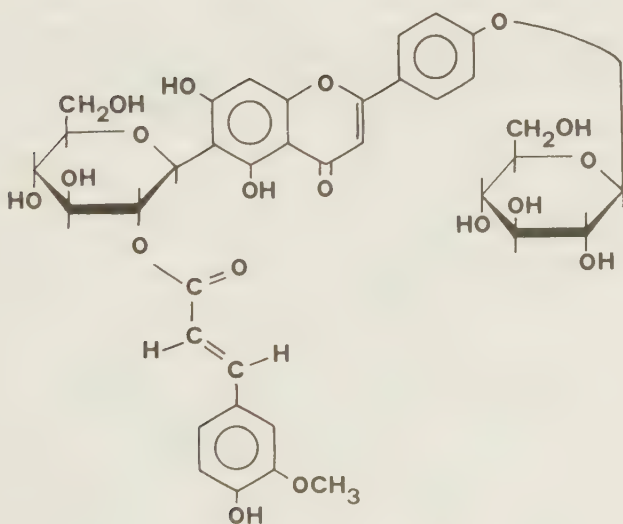
aux trois groupes acétoxyles du reste C-glucosyle et aux quatre groupes acétoxyles du reste O-glucosyle,

- 14 protons aliphatiques correspondant à deux unités de glucose acétylé entre 3,80 - 5,90 ppm dont un à 4,92 ppm (doublet, $J=10\text{Hz}$, H-1") et un à 4,16 ppm (doublet, $J=11\text{Hz}$, H-1'");
- pour la partie féruloyle:
 - un groupe acétoyle aromatique à 2,29 ppm (singulet, Ac-4),
 - un groupe méthoxy aromatique à 3,82 ppm (singulet, MeO-3),
 - trois protons aromatiques entre 7,00 - 7,30 ppm (H-2, H-5 et H-6),
 - deux protons éthyléniques dont un à 6,12 ppm (doublet, $J=16\text{Hz}$, H- α) et un à 7,40 ppm (doublet, $J=16\text{Hz}$, H- β) formant un spectre du type AB.

Le reste féruloyle est attaché sur la partie C-glucosyle de K à la position 2" étant donné l'absence du signal acétyle correspondant. Le déplacement vers les champs hauts des protons H-3' et H-5' par rapport aux protons correspondants de la substance M indique clairement la O-substitution en 4' en l'occurrence par le

reste O-glucosyle. Les configurations β et trans sont attribuées respectivement aux deux restes glucosyles et au féruloyle sur la base des constantes de couplage $J_{H''}=10\text{Hz}$, $J_{H',''}=11\text{Hz}$ et $J_{H-\alpha}=J_{H-\beta}=16\text{Hz}$.

Les preuves étant acquises, nous proposons pour la substance K, la structure de trans-féruloyle-2''-isovitexine-4'-O- β -D-glucoside.



5.2.4. SUBSTANCE D

Le spectre UV de la substance D dans le méthanol est caractéristique d'un dérivé flavonique. Les déplacements des bandes d'absorption causés par les réactifs usuels fixent des groupes hydroxyles en position 5, 7 et 4' et écartent la présence de tout groupe O-dihydroxyle. Quant à la position de la bande I du spectre dans le méthanol, elle nous permet de prévoir une O-substitution en 3' et (ou) en 5' (cf. tableau 2). Aucune contradiction n'étant observée dans les spectres, la substance D est vraisemblablement un dérivé flavonique classique.

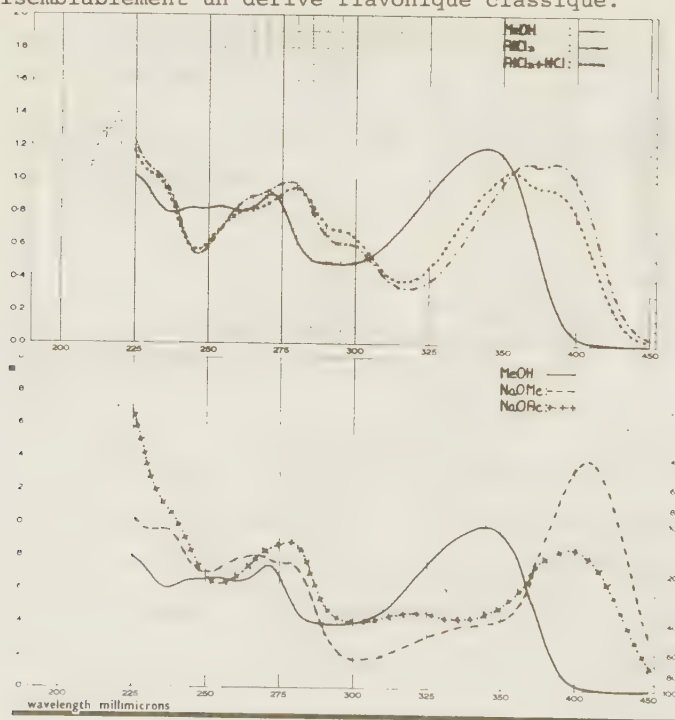


Fig. 109: Spectres UV de la substance D

Réactifs	Maximums (nm)				
MeOH	271		345		
NaOMe	267sh	279	340sh	408	
NaOAc	270sh	280	320sh	396	
AlCl ₃	265sh	278	298sh	366	386sh
AlCl ₃ /HCl	263sh	280	298sh	356	384sh

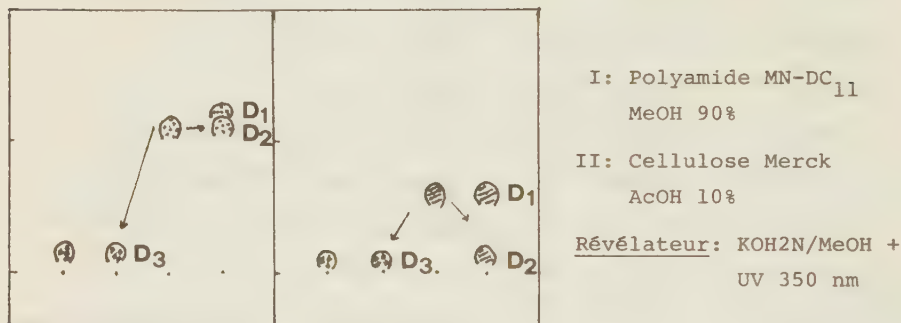
Tableau 26: Relevé des spectres UV de la substance D

Sur couche mince, la substance D accuse un $R_f^{1)}$ (0,66) typique de monoglycoside flavonique (cf. fig. 29), lequel est, d'ailleurs, identique à celui du témoin isolé par Hostettmann [5]. Cet auteur, n'ayant observé aucune modification de la substance sous l'action de HCl dilué, est arrivé à l'hypothèse selon laquelle D est un 6,8-di-C-glycoside flavonique dont les deux restes osidiques sont de même nature.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons répété l'hydrolyse acide de la substance D. Il s'avère que D subit une isomérisation puisque l'analyse de la phase butanolique de l'hydrolysate par CCM révèle deux spots D_1 et D_2 ce que Hostettmann n'a pas pu observer car il n'avait fait usage que d'un système chromatographique (Polyamide/MeOH 90%) (cf. chromatogramme de la figure 109).

¹⁾ Polyamide MN-DC₁₁/MeOH 90%

Quant aux deux autres phases étherée et aqueuse, les analyses sont négatives.



1: Lutéoline

2: D hydrolysé par HI, extrait étheré (D₃)

3: Substance D

4: D hydrolysé par HCl, extrait butanolique (D₁ et D₂)

Fig. 110: Chromatogramme de D hydrolysé

Chromatographiquement, D₁ correspond à D. Une preuve supplémentaire est fournie par les spectres UV de D₁ qui sont identiques à ceux de D, D₁ étant obtenu par séparation du mélange D₁ + D₂ sur une colonne chromatographique de cellulose éluée avec AcOH 30%. La substance D₂ également isolée, présente pratiquement les mêmes spectres UV que ceux de D; D₂ est sans aucun doute l'isomère de D.

La comparaison avec les données de la littérature [11] (Rf, spectres UV), permet d'établir une analogie entre les substances

D_1 , D_2 et les isomères du C-glucosyl chrysoeriol (isoscoparine et scoparine).

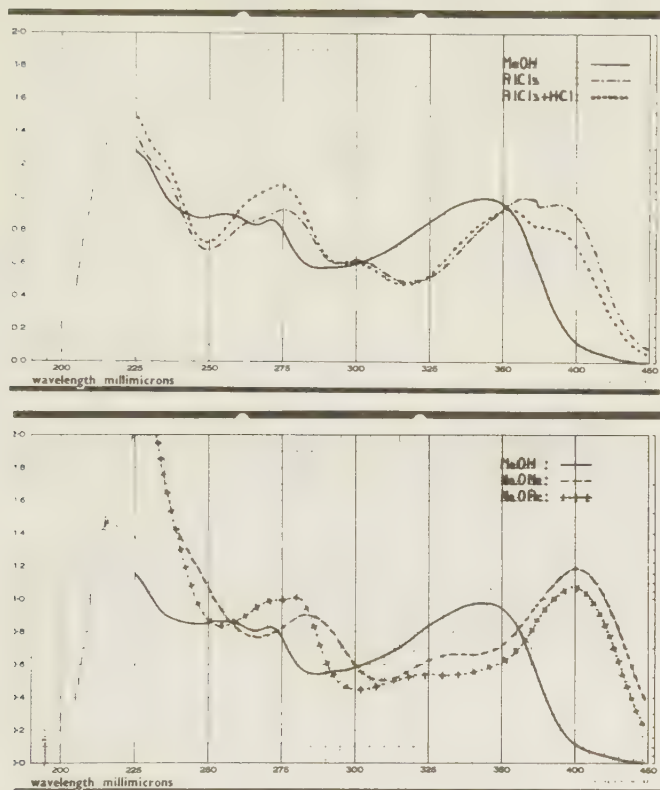


Fig. 111: Spectres UV de D_2

Réactifs	Maximums (nm)				
MeOH	271		345		
NaOMe	282	335sh	400		
NaOAc	270sh	280	320sh	398	
AlCl ₃	263sh	276	300sh	366	388sh
AlCl ₃ /HCl	263sh	275	300sh	355	384sh

Tableau 27: Relevé des spectres UV de D₂

L'étude des comportements chromatographiques de quelques C-glucosides flavoniques nous révèle que les isomères en 6 montrent, sur couche mince de cellulose, un Rf supérieur à leurs homologues en 8, alors que sur couche de polyamide, l'ordre des Rf est inversé (cf. tableau 26). De ce fait, D, qui accuse un Rf supérieur à son isomère D₂ sur couche mince de cellulose, doit être l'isomère en 6.

6-C-gluc.	Rf		8-C-gluc.	Rf	
	I	II		I	II
Isoorientine	0,51	0,22	Orientine	0,57	0,10
Isovitexine	0,55	0,32	Vitexine	0,59	0,13
Swertisine	0,65	0,22 ¹⁾	Isoswertisine	0,71	0,48 ¹⁾
Isoscoparine [31]	-	0,59 ²⁾	Scoparine	-	0,31 ²⁾
D	0,66	0,24	D ₂	0,69	0,07

Tableau 28: Valeurs Rf de quelques isomères de C-glucosyl flavone

I: Polyamide MN-DC₁₁/MeOH 90%

II: Cellulose Merck/AcOH 10%

1) Cellulose Merck/AcOH 15% 2) Papier "Whatmann" no 3/AcOH 20%

Les résultats accumulés nous incitent à penser que la substance D n'est autre que l'isoscoparine, d'autant plus que nous remarquons une similitude parfaite entre les spectres IR de D et de l'isoscoparine [32].

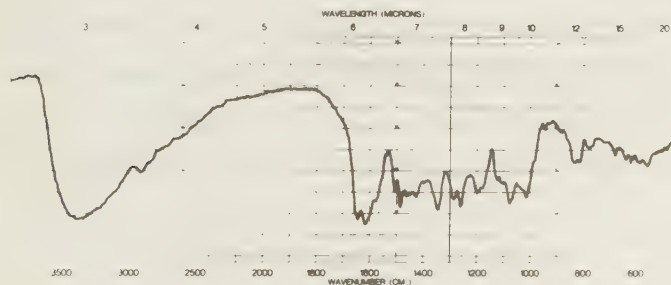


Fig. 112: Spectre IR de la substance D

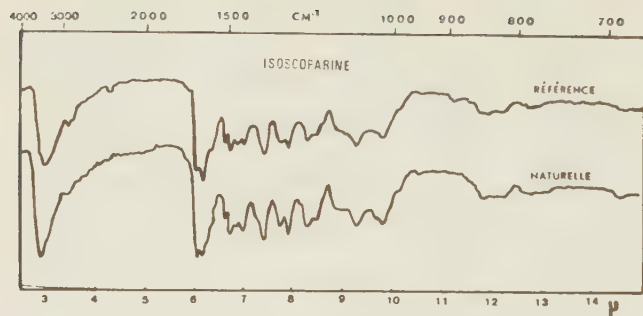


Fig. 113: Spectre IR de l'isoscaparine [32]

Ne possédant pas d'échantillon authentique en vue d'une comparaison, nous avons procédé à une étude de structure.

Le traitement de D par l'acide iodhydrique mène à une flavone répondant, par son comportement chromatographique et ses spectres UV, à la lutéoline. D est donc O-substitué en 3' par un groupe non hydrolysable par HCl dilué, probablement par un groupe méthyle. La confirmation en est faite par la méthylation de la substance D, laquelle conduit à un dérivé Dm dont les données analytiques (CCM, PF, spectre UV, IR, $^1\text{H-RMN}$), sont en tout point identiques à celles de la tétraméthyl-5,7,3',4'-isoorientine obtenue par la méthylation de l'isoorientine

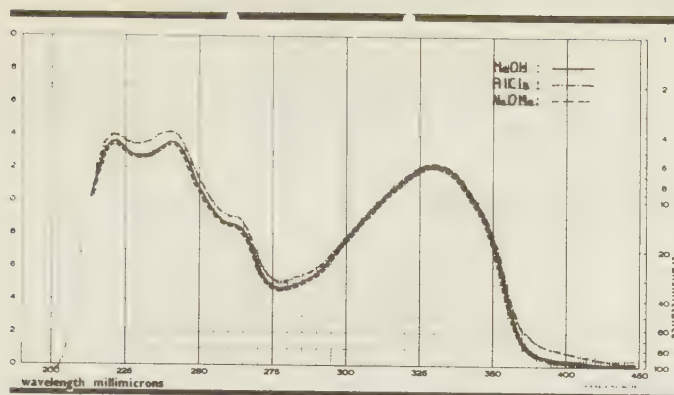


Fig. 114: Spectres UV du dérivé méthylé de D

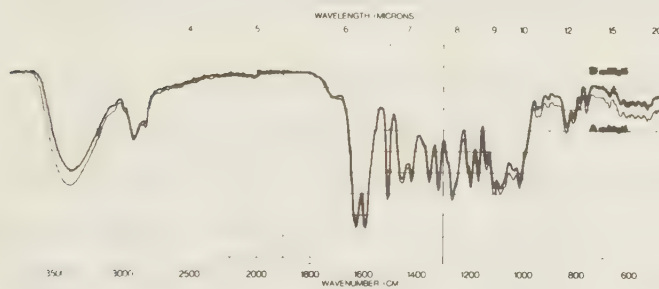


Fig. 115: Spectres IR des dérivés méthylés de D et de 1'isoorientine

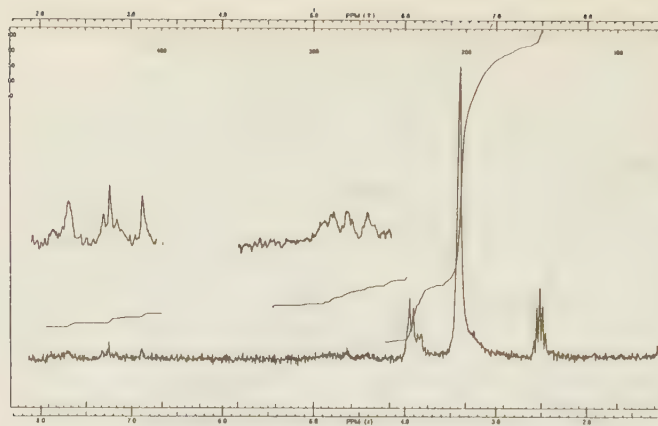


Fig. 116: Spectres ^1H -RMN¹⁾ à 60MHz du dérivé méthylé de D dans DMSO-d_6

1) δ en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne

Dans le spectre ^1H -RMN du dérivé méthylé de D, nous comptons quatre groupes méthoxyles aromatiques apparaissant sous forme de singulets à 3,82, 3,85, 3,90 et 3,95 ppm relatifs aux positions 5, 7, 3' et 4'; cinq protons aromatiques dont un à 6,88 ppm (singulet, H-3), un à 7,23 ppm (singulet, H-8), un à 7,24 ppm (doublet, $J=9\text{Hz}$, H-5'), un à 7,68 ppm (doublet, $J=2\text{Hz}$, H-2') et un à 7,78 ppm (double doublet mal résolu, $J=9\text{Hz}$, H-6'); et 7 protons aliphatiques correspondant à une unité de glucose apparaissant sous forme de multiplet complexe entre 4,10 et 5,10 ppm.

Il apparaît ainsi que la substance D est, sans aucun doute, l'isoscoparine. La preuve définitive est apportée par le spectre ^1H -RMN du dérivé acétylé de D.

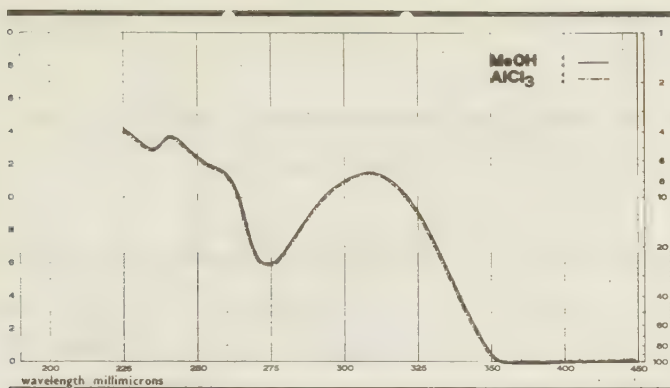


Fig. 117: Spectres UV du dérivé acétylé de D

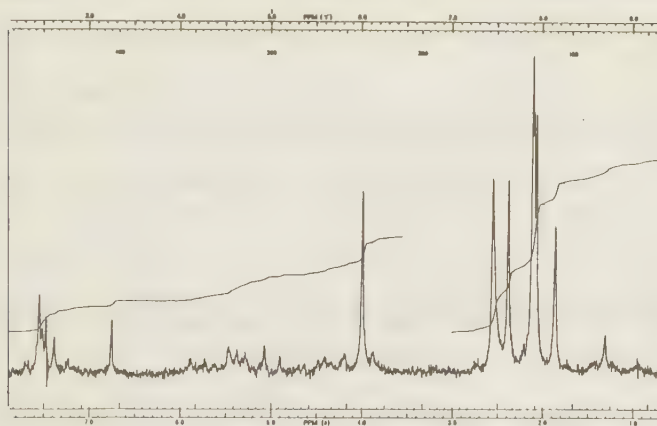


Fig. 118: Spectre ¹H-RMN¹⁾ à 60 MHz du dérivé acétylé de D dans CDCl₃

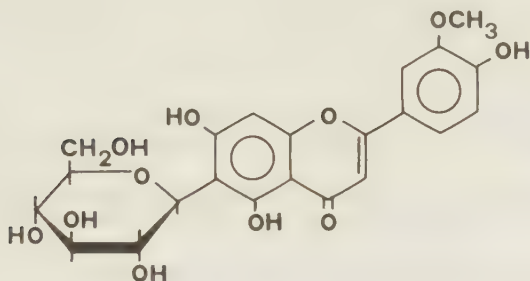
¹⁾ δ en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne

Nous y relevons:

- trois groupes acétoxyles aromatiques dont deux à 2,55 ppm (singulet, Ac-5 et Ac-7) et un à 2,35 ppm (singulet, Ac-4'),
- quatre groupes acétoxyles aliphatiques dont un à 1,85 ppm (singulet, Ac-2"), un à 2,06 ppm (singulet, Ac-6"), un à 2,08 ppm (singulet, Ac-3") et un à 2,10 ppm (singulet, Ac-4"),
- cinq protons aromatiques dont quatre entre 7,20 - 7,70 ppm (H-2', H-5', H-6' et H-8) et un à 6,75 ppm (singulet, H-3),
- sept protons aliphatiques entre 3,80 - 5,90 ppm correspondant à la partie C-glucosidique dont un à 4,98 ppm (doublet, J=10Hz, H-1"),
- un groupe méthoxyle aromatique à 3,95 ppm (singulet, MeO-3').

Le signal acétoxyle aromatique Ac-2" à 1,85 ppm est caractéristique des 6-C-glucosyl flavones. D'autre part, le doublet centré à 4,98 ppm avec la constante de couplage de 10Hz relatif au proton aromatique H-1" attribue la configuration β pour la partie C-glucosyle.

L'isoscoparine (6-C- β -D-glucosyl chrysoeriol)



5.2.5. SUBSTANCES J, C₁, H et G

L'identification des substances C₁, H et G est effectuée par comparaison avec des échantillons isolés des feuilles de Gentiana burseri Lapeyr. Pour la substance J, le témoin est isolé des feuilles de Gentiana verna L. 10 . Les critères d'identification reposent sur:

- le comportement chromatographique
- le comportement aux hydrolyses enzymatique et acide
- les spectres UV et IR
- le point de fusion

Des études comparatives basées sur les critères mentionnés, il ressort que:

J est la O- β -D-glucosyl-2" isoorientine

C₁ est le trans-féruloyl-2" isoorientine-4'-O- β -D-glucoside

H est la trans-féruloyl-2" isoorientine

G est la trans caféoyl-2" isoorientine

A titre indicatif, nous donnons ci-après les spectres UV de J et les spectres IR des quatre substances comparés à ceux des témoins.

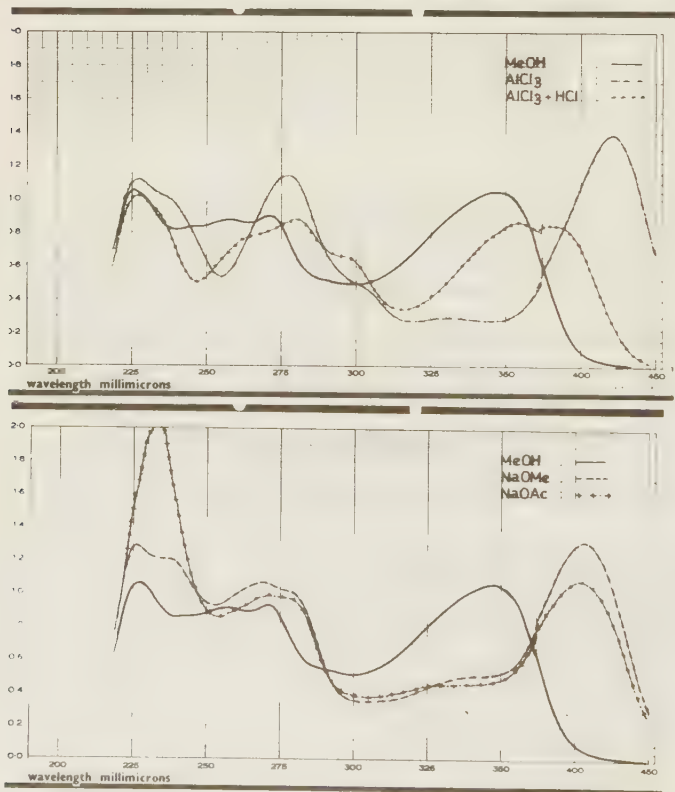


Fig. 119: Spectres UV de la substance J

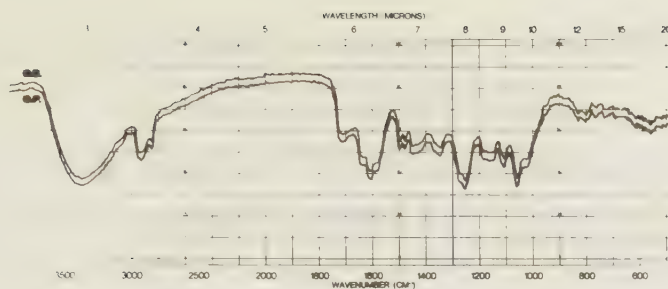


Fig. 120: Spectres IR de C_1 de G. burseri et G. punctata

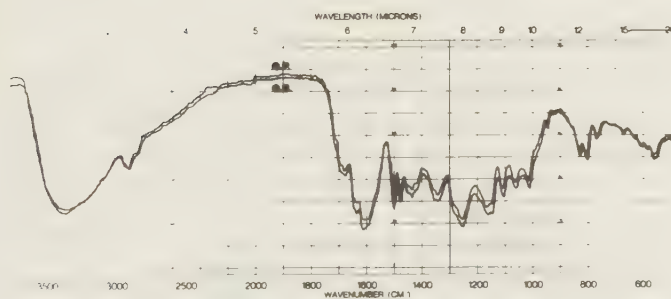


Fig. 121: Spectres IR de H de G. burseri et de G. punctata

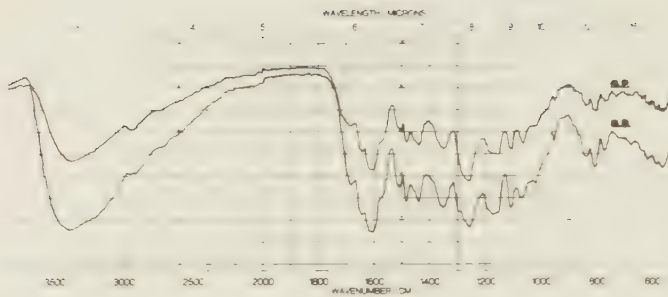


Fig. 122: Spectres IR de G de G. burseri et de G. punctata

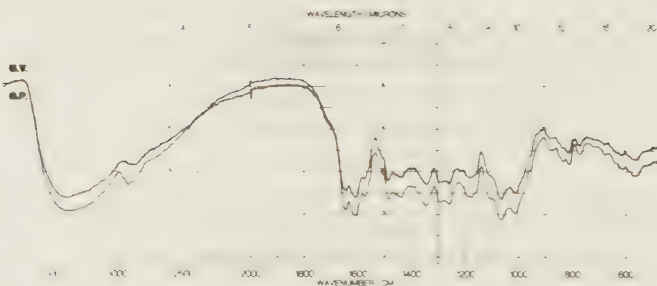


Fig. 123: Spectres IR de J de G. punctata et de G. verna

6. RESUME ET CONCLUSION

Les premiers travaux consacrés à Gentiana burseri Lapeyr. et à Gentiana punctata L. avaient permis de mettre en évidence les C-glucosides, isoorientine et isovitexine, ainsi que leurs 4'-O-glucosides [3].

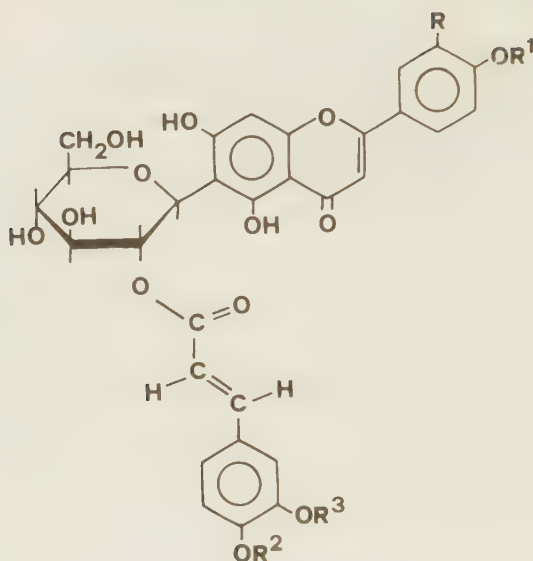
Nous avons été à même, grâce à une recherche plus approfondie, d'identifier d'autres substances (voir tableau 27). Parmi celles-ci, nous devons relever les cinnamoyl-C-glucosyl flavones, nouveaux types de composés dont nous avons décrit, pour la première fois, la structure [33], [34], [35].

Espèces \ Substances											
	C ₁	C ₂	D	E*	G	H	I	J	K	L	M
G. burseri Lapeyr.	x	x		x	x	x	x				
G. punctata L.	x		x		x	x		x	x	x	x

Tableau 27: Substances isolées dans Gentiana burseri Lapeyr. et Gentiana punctata L.

Les structures des substances isolées sont décrites ci-après:

Cinnamoyl-C-glucosyl flavones



R	R ¹	R ²	R ³
---	----------------	----------------	----------------

Di-O-glucoside:

p-β-D-glucosyl-trans-caféoyl-2"

isoorientine-4'-O-β-D-glucoside: E *

OH	gluc	gluc	H
----	------	------	---

O-glucosides:

trans-féruloyl-2" isoorientine-

4'-O-β-D-glucoside:

C ₁	OH	gluc	H	CH ₃
----------------	----	------	---	-----------------

trans-féruloyl-2" isovitexine-

4'-O-β-D-glucoside:

K	H	gluc	H	CH ₃
---	---	------	---	-----------------

trans-caféoyl-2" isoorientine-

4'-O-β-D-glucoside:

L	OH	gluc	H	H
---	----	------	---	---

Aglucones:

trans-féruloyl-2" isovitexine:

M	H	H	H	CH ₃
---	---	---	---	-----------------

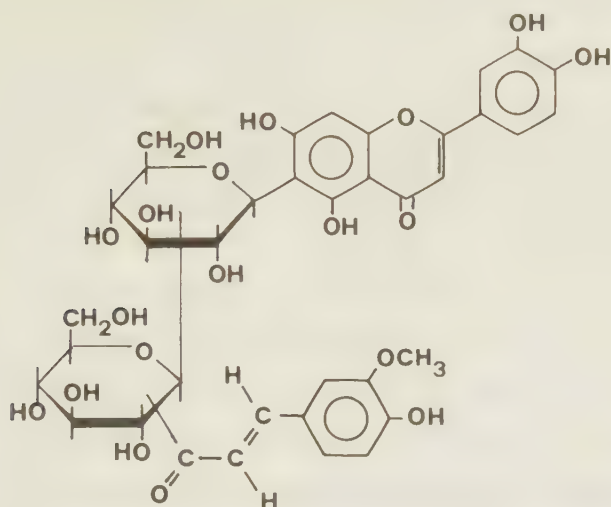
trans-caféoyl-2" isoorientine:

G	OH	H	H	H
---	----	---	---	---

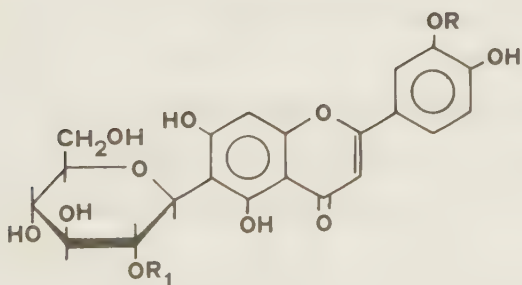
trans-féruloyl-2" isoorientine:

H	OH	H	H	CH ₃
---	----	---	---	-----------------

C₂: trans-féruloyl-X''-O-β-D-glucosyl-X" isoorientine



Glucosyl flavones

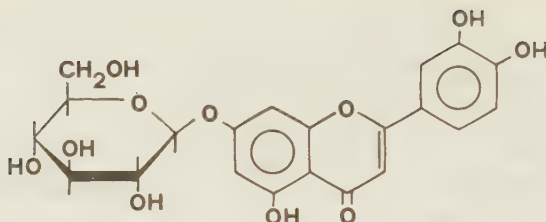


D: Isoscoparine

R = CH₃, R₁ = H

J: O-β-D-glucosyl-2" isoorientine

R = H, R₁ = β-D-glucosyl

I: O- β -D-glucosyl-7 lutéoline

Les cinnamoyl-C-glucosyl flavones font partie du groupe des flavones acylées par des acides organiques tels que les acides malonique [36], trans-caféique [37], [38], trans-p-coumarique [39], [40], [41], [42] et acétique [43], [44], [45]; les deux derniers sont les plus fréquents.

Pour les O-glycosides et les aglycones flavoniques, l'acylation s'effectue indifféremment au niveau des hydroxyles glucidiques en 4 ou en 6 et exclusivement au niveau de l'hydroxyle phénolique en 4' du squelette flavonique. Les aglycones sont principalement la lutéoline, le chrysoeriol et l'apigénine.

Les C-glycosyl flavones acylées connues jusqu'à présent sont peu nombreuses. La première est sans doute la p-hydroxy-

benzoyl-2" vitexine isolée et identifiée par Horowitz & Gentili [46] en 1966 à partir de Vitex lucens (Verbenaceae). En 1974, une seconde fut mentionnée dans les feuilles de Brackenridgea zanguebarica Oliv. (Ochnaceae) par Bombardelli et coll. [47] comme étant l'acétyl-2"-méthyl-7 vitexine. Dès lors, à notre connaissance, aucun autre composé n'a été cité.

Les sept C-glucosyl flavones acylées que nous avons identifiées se révèlent être les premières dans leur genre puisqu'il s'agit, pour le groupe acylant, de dérivés de l'acide cinnamique, en l'occurrence les acides caféique et férulique. Parallèlement à nos travaux, Sood et coll. [48] ont caractérisé un composé acylé analogue aux nôtres, la p-coumaroyl-2" vitexine, à partir des graines de Trigonella foenumgraecum (Leguminosae). Signalons aussi que Monties et coll. [49] ont mentionné la présence, dans les feuilles de Cucumis melo (Cucurbitaceae) de deux autres dérivés acylés, les trans-caféoyl-X"-O-glucosyl-X" de l'isovitexine et de l'isoorientine, lesquels s'apparentent à la substance C₂ (trans-féuloyl-X"-O-glucosyl-X" isoorientine) que nous avons isolée des feuilles de Gentiana burseri Lapeyr.

L'isoscoparine a été citée en 1968 par Chopin et coll. [50] qui l'ont obtenue par isomérisation de la scoparine naturelle et ensuite identifiée avec un échantillon synthétique. Son existence, à l'état naturel, est mise en évidence par Wallace et coll. [13] en 1969 dans Lemna minor (Lemnaceae) seulement sur la base des données chromatographiques et spectrales (UV). Ce

n'est qu'en 1972 que Boutard et coll. [32] ont établi la présence certaine de l'isoscoparine dans Potamogeton natans L. (Fluviales); la structure étant déterminée par comparaison avec un échantillon synthétique [31]. Depuis, l'isoscoparine a été signalée dans les bulbes de Urginea maritima Baker par Fernandez et coll. [51] et dans Avena sativa (Gramineae) par Chopin et coll. [52].

L'isoorientine-2"-O-glucoside n'a été décelé, jusqu'à présent, que dans la famille Gentianaceae, pour la première fois dans Gentiana verna L. par Hostettmann & Jacot-Guillarmod [10] et dans Gentiana asclepiadea par Goetz et coll. [53].

Quant au lutéoline-7-O-glucoside, un des glycosides flavoniques les plus répandus dans la nature, il a été cité, pour la première fois, comme constituant de Humulus japonicus (Cannabaceae) par Hattori et Matsuda [54] en 1949.

Au point de vue de la phytochimie comparée, que certains auteurs nomment "chimiotaxonomie", nos résultats complètent et précisent ceux de nos devanciers [3] [5]. Hostettmann [5] a établi un premier tableau comparatif pour les espèces de la section Gentiana (anciennement: section Coelanthé Grisebach) qui montre une assez grande homogénéité dans la composition en

composés polyphénoliques. Gentiana lutea occupe toutefois une position particulière à cause de la présence chez cette espèce de xanthones dans les feuilles. La même constatation a été faite par Verney et Debelmas [59] qui ont recherché les xanthones dans les divers organes des G. lutea, G. purpurea, G. punctata et G. pannonica. Les auteurs français ont montré aussi que G. lutea était caractérisé par la présence dans ses racines d'une xanthone particulière, l'hydroxy-1 diméthoxy-3,7 xanthone. Faisons remarquer que l'originalité de Gentiana lutea existe aussi sur le plan morphologique (ancienne section Asterias)

Hostettmann [5] mentionnait toutefois dans la section Gentiana la présence de flavones non encore identifiées et dont la répartition pouvait éventuellement servir à caractériser des espèces ou des groupes d'espèces.

En fait, la situation telle qu'elle ressort de la présente étude est la suivante:

On voit par le tableau 27 que G. punctata diffère de G. burseri par la présence, non seulement de l'isoscoparine (substance D) et de l'isoorientine-2"-O-glucoside (substance J) mais aussi des trois cinnamoyl C-glucosyl flavones K, L et M qui sont respectivement le trans-féruloyl-2" isovitexine-4'-O-glucoside, le trans-caféoyl-2" isoorientine-4'-O-glucoside et la trans-féruloyl-2" isovitexine.

Quant à G. burseri, elle offre les substances E* (p-β-D-glucosyl-trans-caféoyl-2" isoorientine-4'-O-glucoside) et I (=lutéoline-7-O-glucoside). Pour pouvoir tirer des conclusions

applicables à la systématique de la section Gentiana, il faudrait rechercher dans les autres espèces les substances nouvellement identifiées dans G. punctata et G. burseri.

D'après Favarger [60] , la section Gentiana (à l'exclusion de G. lutea) comprend deux groupes d'espèces qui se distinguent par la morphologie et la distribution géographique. Dans le premier groupe, le calice est symétrique et divisé en dents et le centre de gravité de la distribution est oriental (G. punctata, G. pannonica).

Dans le deuxième groupe, le calice est fendu en spathe, et la distribution est plutôt occidentale (Alpes centrales, occidentales, Pyrénées). (G. purpurea, G. villarsii, G. burseri). Ces trois dernières espèces peuvent être considérées comme vicariantes, ce qui autorise à les tenir pour étroitement apparentées.

On peut imaginer d'autres affinités. Par exemple Merxmüller (1962) pencherait plutôt pour grouper ensemble les espèces à fleurs pourpres (G. pannonica et G. purpurea) dont les aires sont vicariantes, et les espèces à fleurs jaunes (G. punctata, villarsii et burseri).

Il serait fort intéressant de voir laquelle de ces deux hypothèses se trouve confirmée par le spectre complet des glycosides flavoniques.

7. PARTIE EXPERIMENTALE

7.1. DONNÉES ANALYTIQUES DES SUBSTANCES

7.1.1. CARACTERISTIQUES CHROMATOGRAPHIQUES ET POINT DE DECOM- POSITION

Les valeurs Rf mentionnées dans les tableaux qui suivent représentent la moyenne de cinq mesures calculées avec une distance de migration du solvant de 15 cm.

7.1.1.1. Substances identifiées

Les valeurs Rf dans divers systèmes chromatographiques ainsi que les points de décomposition des nouvelles substances identifiées dans Gentiana burseri Lapeyr. et Gentiana punctata L. sont groupées dans le tableau ci-après:

Substances	Polyamide MN-DC ₁₁		Cellulose F Merck			SiO ₂ Merck	Point de décomposi- tion (°C)
	I	II	III	IV	V	VI	
C ₁	0,59	0,87	0,53	0,60	0,21	0,50	192-195
C ₂	0,58	0,85	0,49	0,63	0,12	0,48	202-209
D	0,56	0,84	0,29	0,54	0,43	0,66	207-209
D ₂	0,59	0,80	0,05	0,34	0,30	0,70	198-199
E*	0,67	0,99	0,69	0,38	0,03	0,14	203-208
G	0,19	0,25	0,30	0,79	0,16	0,54	212-216
H	0,32	0,57	0,32	0,84	0,43	0,60	197-200
I	0,35	0,47	0,04	0,83	0,15	0,49	232-235
J	0,70	0,95	0,64	0,49	0,09	0,29	207-209
K	0,78	0,97	0,65	0,57	0,23	0,51	197-199
L	0,54	0,45	0,49	0,60	0,07	0,42	202-205
M	0,46	0,74	0,45	0,85	0,61	0,81	173-175

SiO₂: Silicagel 60 F 254 (Merck)

I: MeOH 90%

IV: n-BuOH-AcOH-H₂O

II: Benzène-MeOH-AcOH

(4 : 1 : 5) ph. sup.

(65 : 32 : 16)

V: CHCl₃-AcOH-H₂O (5:4:1)

III: AcOH 10%

VI: AcOEt-MeOH-H₂O (80:30:7)

Tableau 28: Valeurs R_f et points de décomposition des substances identifiées

7.1.1.2. Substances témoins

Les caractéristiques chromatographiques des substances de référence sont résumées dans le tableau ci-après:

Témoins	Polyamide MN-DC ₁₁		Cellulose F Merck			SiO ₂ Merck
	I	II	III	IV	V	VI
Isovitexine-4'-O-gluc.: F	0,82	0,99	0,59	0,43	0,02	0,18
Isoorientine-4'-O-gluc.:E	0,80	0,99	0,46	0,35	0,05	0,21
Vitexine	0,59	0,73	0,11	0,47	0,20	0,69
Isovitexine: B	0,56	0,76	0,34	0,62	0,32	0,65
Orientine	0,52	0,48	0,03	0,35	0,03	0,56
Isoorientine: A	0,49	0,51	0,20	0,51	0,13	0,49
Lutéoline	0,07	0,66	0,01	0,85	0,37	0,99

Tableau 29: Valeurs Rf des témoins

I: MeOH 90%

II: Benzène-MeOH-AcOH

(65 : 32 : 16)

III: AcOH 10%

IV: n-BuOH-AcOH-H₂O

(4 : 1 : 5) ph. sup.

V: CHCl₃-AcOH-H₂O (5:4:1)

VI: AcOEt-MeOH-H₂O (80:30:7)

7.1.2. COMPOSITIONS CENTESIMALES ET POINTS DE DECOMPOSITION

DES DERIVES ACETYLES

Les résultats des analyses élémentaires des dérivés acétylés des substances identifiées ainsi que les points de décomposition sont réunis dans le tableau ci-dessous:

Dérivés acétylés	Formule brute	PM	Point de dé- comp. (°C)	Composition centésimale (%)			
	C H O			Calculée		Trouvée	
				C	H	C	H
D	36 36 18	756,57	146-147	57,15	4,79	56,76	5,09
E*	72 76 39	1565,36	141-144	55,24	4,85	55,20	5,30
G	47 44 23	944,96	96-100	59,74	4,69	59,65	5,35
H	47 44 22	960,86	204-207	58,75	4,62	57,13	4,70
K	57 58 28	1191,06	168-170	57,48	4,90	56,77	4,83
L	60 60 31	1277,11	145-148	56,43	4,73	55,59	4,68

Tableau 30: Composition centésimale et points de décomposition
des dérivés acétylés

7.2. TECHNIQUES D'ANALYSE

La chromatographie sur couche mince a été exposée précédemment (cf. paragraphe 3.3.2.6.)

7.2.1. LES REACTIONS DE DEGRADATION

7.2.1.1. Hydrolyse enzymatique

La substance (1 mg) à traiter est dissoute dans 4 ml de solution tampon AcOH/AcONa 0,5 M pH 5. A la solution résultante sont ajoutés 2 mg d'enzyme β -glucosidase (Fluka purum). Le mélange est ensuite laissé reposer à la température de 37°. Après 24 heures, celui-ci est extrait successivement à l'éther et au n-butanol. Les extraits sont purifiés par filtration sur une petite colonne (l = 10 cm; d = 1 cm; solvant = méthanol) de Sephadex LH 20 et analysés par CCM et spectroscopie UV.

7.2.1.2. Hydrolyse par HCl dilué

L'échantillon (2-3 mg) est dissous dans le minimum de méthanol possible. Après l'addition de 10 ml de solution HCl2N,

le mélange est chauffé à reflux pendant deux heures. Il est ensuite concentré sous pression réduite à 40° et extrait successivement à l'éther et au n-butanol. Les extraits sont alors purifiés au moyen d'une petite colonne de Sephadex LH 20 (MeOH) et analysés par CCM et spectroscopie UV. Pour les cinnamoyl-C-glucosides flavoniques, l'extrait étheré est en outre fractionné selon le schéma de la figure 31 avant la purification.

Les analyses par CCM des sucres libérés dans la phase aqueuse sont effectuées avec les systèmes chromatographiques suivants:

Cellulose microcristalline Merck: Pyridine-AcOEt-AcOH-H₂O
(5 : 5 : 1 : 3)

AcOEt-AcOH-H₂O
(10 : 2 : 3)

Silicagel 60 F 254 Merck: AcOEt-AcOH-H₂O-MeOH
(65 : 20 : 15 : 15)

Les réactifs employés pour révéler les sucres sont:

- le phtalate d'aniline qui colore les sucres en brun
- le phtalate de p-anisidine qui colore les hexoses en vert, les pentoses en rouge violacé, les méthylpentoses en vert jaunâtre et les acides uroniques en brun.

Préparation du phtalate d'aniline

0,93 g d'aniline et 1,66 g d'acide phtalique sont dissous dans un mélange formé de 10 ml d'eau et 90 ml de n-butanol.

Préparation du phtalate de p-anisidine

1,23 g de p-anisidine et 1,66 g d'acide phtalique sont dissous dans 100 ml d'éthanol.

7.2.1.3. Hydrolyse par HI

Le C-glucoside (10 mg) est mélangé avec 100 mg de phénol fraîchement distillé et 1 ml d'acide iodhydrique (densité 1,7). Le mélange est introduit dans un tube qui est ensuite scellé et maintenu pendant 5 heures à l'étuve à 150°C. Après refroidissement, le mélange réactionnel est versé dans 10 ml d'une solution d'hydrogénosulfite de sodium à 20%. Le précipité formé est alors filtré et lavé à l'eau chaude et au méthanol à 10%. L'aglycone obtenu est purifié par passage à travers une colonne de Sephadex LH 20 avec le méthanol comme éluant.

7.2.2. LES REACTIONS DE TRANSFORMATION

7.2.2.1. Silylation [55]

L'acide organique (2 mg) est placé sous atmosphère d'azote dans un "Schlenk". On y injecte à l'aide d'une seringue 0,5 ml de mélange contenant de l'hexaméthylidisilazane (HMDS), du triméthylchlorosilane (TMCS) et de la pyridine dans les proportions (3:1:9). Le mélange réactionnel est vigoureusement agité pendant 30 secondes et ensuite laissé reposer à température ambiante pendant 5 minutes toujours sous atmosphère d'azote. 10 µl de la solution sont injectés directement dans le chromatographe.

7.2.2.2. Méthylation

Le réactif utilisé pour la méthylation est le diazométhane, lequel est préparé selon DeBoer & Backer [56] à partir du N-nitroso-4-toluène-sulfométhylamide (Fluka purum).

La substance (3 - 50 mg) est dissoute dans le minimum possible de méthanol absolu. Après l'addition d'un excès de solution étherée de diazométhane (dix fois la quantité théorique nécessaire), le mélange est gardé pendant 48 heures dans l'armoire frigorifique à 4°C puis encore 24 heures à température

ambiante. Une portion du mélange est prélevée et évaporée à sec. Le résidu, repris dans le méthanol, est soumis aux analyses par CCM. Dans le cas où la méthylation s'avère incomplète (obtention d'un spot fluorescent bleu et d'un spot brun par CCM), le mélange est évaporé à sec, repris dans le méthanol et traité encore une fois au diazométhane (cinq fois la quantité théorique requise) comme précédemment.

Le dérivé méthylé est ensuite purifié par passage sur une colonne de Sephadex LH 20 avec le méthanol comme éluant. Le contrôle supplémentaire de la méthylation complète est opéré au moyen des spectres UV (aucun déplacement avec les réactifs usuels).

7.2.2.3. Acétylation

10 mg du dérivé flavonique sont ajoutés à un mélange constitué de 10 ml d'anhydride acétique (Fluka puriss) fraîchement distillé, 2 ml de pyridine (Fluka puriss) séchée sur la potasse et une pointe de spatule d'acétate de sodium anhydre. La suspension est maintenue sous agitation constante pendant 24 heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite analysé par CCM pour s'assurer que l'acétylation est complète (obtention d'un seul spot fluorescent). Dans le cas contraire, le temps de réaction est prolongé et éventuellement un chauffage à 40°C du mélange

s'avère nécessaire. Le mélange est alors concentré sous pression réduite à 50°C et 30 ml d'eau froide y sont additionnés. Le précipité formé est recueilli par filtration sur un verre fritté et lavé avec beaucoup d'eau. Le dérivé acétylé ainsi obtenu est recristallisé dans l'éthanol.

7.2.3. LES METHODES SPECTROSCOPIQUES

7.2.3.1. La spectroscopie UV

Les spectres UV ont été enregistrés avec un appareil UNICAM SP 800. Le solvant choisi est le méthanol de préférence à l'éthanol car selon Porter & Markham [57] la présence de traces d'eau dans l'éthanol ou dans le réactif AlCl_3 provoque une inhibition partielle de la formation de complexes; cette inhibition est pratiquement inexistante lorsque du méthanol a été employé. La concentration de la solution est adaptée de manière telle que l'absorbance maximale soit comprise entre 0,8 et 1,2. Les spectres en présence des réactifs AlCl_3 , $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$, NaOMe et NaOAc sont effectués selon Mabry et coll. [11]. (sh: épaulement)

7.2.3.2. La spectroscopie IR

Les substances ont été examinées sous forme de pastilles de KBr à 0,5%. Les spectres ont été enregistrés au moyen du spectrophotomètre PERKIN-ELMER modèle 521.

7.2.3.3. Résonance magnétique nucléaire

Les solvants employés sont le diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO-d_6) pour les dérivés méthylés et le chloroforme deutéré (CDCl_3) pour les dérivés acétylés. Les spectres ^1H -RMN à 60 MHz ont été enregistrés au moyen d'un appareil VARIAN A-60; ceux à 90 et 270 MHz ont été relevés par la maison Hoffmann - La Roche & Co à Bâle.

7.2.3.4. La chromatographie en phase gazeuse

Les chromatogrammes ont été enregistrés sur un appareil PERKIN-ELMER modèle 990 muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID).

Le tableau suivant résume les conditions expérimentales employées lors de l'analyse des dérivés méthylés et triméthyl-

silylés des acides organiques.

Substances Conditions expérimentales	Acides méthylés	Acides silylés
Colonne: phase station. support	NPGS 5% Chromosorb G (80-100 mesh)	OV 17 2% Chromosorb W
Dimensions (l;Ø (cm))	1; 200	1; 200
Quantité (µl)	10	10
Temp. injection (°C)	320	300
Temp. détecteur (FID) (°C)	320	300
Temp. four	200-230; 1,5°/mn	180-270; 6°/mn
Gaz porteur	He	He
Débit (ml/mn)	30	20
Vitesse du papier (cm/mn)	1	1

Tableau 31: Conditions expérimentales pour la chromatographie
en phase gazeuse

7.2.3.5. Spectrométrie de masse

Les spectres de masse ont été enregistrés avec un appareil
HITACHI-PERKIN-ELMER RMU-6L dans les conditions suivantes:

Potentiel d'ionisation:	75 eV
Courant d'émission ionique:	$50 \cdot 10^{-6}$ A
Pression:	10^{-6} torr
Voltage du photomultiplicateur:	5 Kv
Courant du filament:	3,2 A
Courant de la cible:	$2 \cdot 10^{-6}$ A
Température de la source:	200°C
Echelle de masse:	500
Vitesse du papier:	100 mm/sec.
Sensibilité:	1

Le système GC-MS comprend un chromatographe en phase gazeuse PERKIN-ELMER modèle 990 et le spectrographe de masse muni d'un séparateur de BIEMANN.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. Bellmann & A. Jacot-Guillarmod, *Helv* 56, 284 (1973)
- [2] K. Hostettmann, G. Bellmann, R. Tabacchi & A. Jacot-Guillarmod, *Helv.* 56, 3050 (1973)
- [3] K. Hostettmann, M.D. Luong, M. Goetz & A. Jacot-Guillarmod, *Phytochemistry* 14, 499 (1975)
- [4] R. Scharfetter, "Biographie von Pflanzensippen", p. 315-331, Springer, Wien (1953)
- [5] K. Hostettmann, Thèse, Université de Neuchâtel (1973)
- [6] J. Karangwa, Travail de diplôme, Université de Neuchâtel (1972)
- [7] L.S. Bark & R.J.T. Graham, *J.Chromatog.* 27, 109 (1967)
- [8] K.M. Johnston, D.J. Stern & A.C. Waiss Jr., *J. Chromatog.* 33, 539 (1968)
- [9] M. Joustra, B. Söderqvist & L. Fischer, *J. Chromatog.* 28, 21 (1967)
- [10] K. Hostettmann & A. Jacot-Guillarmod, *Helv.* 58, 130 (1975)
- [11] T. J. Mabry, K.R. Markham & M.B. Thomas, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer, New York (1970)
- [12] J. Chopin, M.L. Bouillant & A. Durix, *C.R. Acad. Sci. Paris, Série C* 260, 4850 (1965)
- [13] J.W. Wallace, T.J. Mabry & R.E. Alston, *Phytochemistry* 8, 93 (1969)
- [14] B. Gentili & R.M. Horowitz, *J.Org.Chem.* 33, 1571 (1968)
- [15] J. Krause, *Z. Pflanzenphysiol.* 79, 465 (1976)
- [16] A. Marston, K. Hostettmann & A. Jacot-Guillarmod, *Helv.* 59, 2596 (1976)
- [17] B. Voirin, M. Jay & M. Hauteville, *Phytochemistry* 15, 840 (1976)
- [18] S.C. Chhabra, S.R. Gupta, C.S. Sharma & N.D. Sharma, *Phytochemistry* 16, 1109 (1977)

- [19] F. Wessely & G.H. Moser, *Mh. Chem.* 56, 97 (1920)
- [20] P. Ribéreau-Gayon, *Les Composés Phénoliques des Végétaux*, Dunod, Paris (1968)
- [21] A.H. Williams, *Chemistry & Industry*, 120 (1955)
- [22] J.S. Challice & A.H. Williams, *J. Chromatog.* 21, 357 (1966)
- [23] K. Hostettmann & A. Jacot-Guillarmod, *Helv.* 57, 204 (1974)
- [24] W.E. Hillis & D.H.S. Horn, *Austr. J. Chem.* 18, 531 (1965)
- [25] C.I. Jose, P.S. Phadke & A.V. Rama Rav, *Spectrochimica Acta* 30A, 1199 (1974)
- [26] D.S. Noyce, P.A. King, F.B. Kirby & W.L. Reed, *J.A.C.S.* 84 1632 (1962)
- [27] J. Krause, *Z. Pflanzenphysiol.* 79, 465 (1976)
- [28] W.A. Hutchins & T.S. Wheeler, *J.Chem.Soc.* 91 (1939)
- [29] T. Higashino, T. Washizu & E. Hayashi, *Yakugaku Zasshi* 93, 1234 (1973)
- [30] B. Voirin, *Phytochemistry* 14, 257 (1975)
- [31] J. Chopin, A. Durix, M.L. Bouillant, *C.R.Acad.Sci. Paris, Série C* 265, 1334 (1967)
- [32] B. Bontard, M.L. Bouillant, J. Chopin & P. Lebreton, *C.R. Acad.Sci. Paris, Serie D* 274, 1099 (1972)
- [33] A. Jacot-Guillarmod, Luong Minh Duc & K. Hostettmann, *Helv.* 58, 1477 (1975)
- [34] M.D. Luong, K. Hostettmann & A. Jacot-Guillarmod, *Helv.* 59, 1294 (1976)
- [35] M.D. Luong & A. Jacot-Guillarmod, *Helv.* 60, 2099 (1977)
- [36] F. Kreuzaler & K. Hahlbrock, *Phytochemistry* 12, 1149 (1973)
- [37] E.V. Gella, Y.G. Borisjuk & V.I. Litvinenko, *Farmatseut. Zh* 21, 58 (1966)
- [38] E.V. Gella, G.V. Makarova & J.G. Borisjuk, *Farmatseut. Zh*, 22, 80 (1967)

- [39] L. Birkhofer, C. Kaiser & F. Becker, Z. Naturforschung 20b, 923 (1965)
- [40] C. Karl, G. Müller & P.A. Pedersen, Phytochemistry 15, 1084 (1976)
- [41] V.V. Petrenko, Khim.Prir.Soedin. 6, 414 (1965)
- [42] I.P. Sheremet & N.F. Komissarenko, Khim.Prir. Soedin 7, 845 (1971)
- [43] N. Morita, Yakugaku Zasshi 94, 913 (1974)
- [44] L.S. Teslov, Khim.Prir.Soedin 2, 256 (1976)
- [45] M.I. Borisov, A.G. Serbin & N.F. Komissarenko, Khim.Prir. Soedin 8, 281 (1972)
- [46] R.M. Horowitz & B. Gentili, Chemistry & Industry , 625 (1966)
- [47] E. Bombardelli, A. Bonati, B. Gambetta & G. Mustich, Phytochemistry 13, 295 (1966)
- [48] A.R. Sood, B. Bontard, M. Chadenson, J. Chopin & P. Lebreton, Phytochemistry 15, 351 (1976)
- [49] B. Monties, M.L. Bouillant & J. Chopin, Phytochemistry 15, 1053 (1976)
- [50] J. Chopin, A. Durix & M.L. Bouillant, C.R. Acad.Sci. Paris, Série C 266, 1334 (1968)
- [51] M. Fernandez, J. Renedo, T. Arrupe & F.A. Vega, Cienc.Ind. Farm. 6, 386 (1974)
- [52] J. Chopin, G. Dellamonica, M.L. Bouillant, A. Besset, G. Popovici & G. Weissenböck, Phytochemistry 16, 2041 (1977)
- [53] M. Goetz, K. Hostettmann & A. Jacot-Guillarmod, Phytochemistry 15, 2014 (1976)
- [54] S. Hattori & M. Matsuda, Acta Phytochim. Japan. 15, 233 (1949)
- [55] E.D. Pellizzari, C.M. Chuang, J. Kuc' & E.B. Williams, J. Chromatog. 40, 285 (1969)
- [56] Th. J. De Boer & H.J. Backer, Organic Syntheses 4, p. 250, J. Wiley & Sons, New York (1963)
- [57] L.J. Porter & K.R. Markham, Phytochemistry 9, 1363 (1970)

- [58] I. Horman & R. Viani, Organic Magnetic Spectrometry, 5, 203 (1971)
- [59] A.M. Verney & A.M. Debelmas, Ann. Pharm. fr. 31, 415 (1973)
- [60] C. Favarger, Communication orale

